

Ph.D. értekezés

**REDOX FEHÉRJÉK
BIONANOKOMPOZITOKBAN**

Magyar Melinda

Témavezető: Hernádi Klára, egyetemi tanár

Nagy László, egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem

Tertmészettudományi és Informatikai Kar

Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet

Környezettudományi Doktori Iskola

Szeged, 2015

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	10
2.1 Nanokompozitok.....	10
2.1.1 Bionanokompozitok	12
2.2 Fotoszintetikus rendszerek fényenergia hasznosítása	12
2.3 Redox proteinek.....	14
2.3.1 A fotoszintetikus reakciócentrum fehérje szerkezete.....	14
2.3.1.1 A <i>Rb. sphaeroides</i> reakciócentrum spektroszkópiája	17
2.3.1.2 Egyszeri töltésszétválasztás.....	18
2.3.2 A peroxidáz enzim	20
2.3.2.1 A tormaperoxidáz	21
2.4 Szén nanocsövek.....	24
2.5 Bioszenzorok	26
2.5.1 Enzimatis bioszenzorok	27
2.5.1.1 Enzim immobilizálási módszerek.....	28
2.5.1.2 Bioszenzorokban alkalmazott nanoanyagok	29
2.5.1.3 H ₂ O ₂ bioszenzorok	31
3. Célkitűzések.....	32
4. Anyagok és módszerek	34
4.1 Mintaelőkészítés, preparatív eljárások.....	34
4.1.1 A <i>Rhodobacter sphaeroides</i> baktériumtörzs tenyésztése.....	34
4.1.2 Reakciócentrumok preparálása	35
4.1.3 Peroxidáz enzim oldat készítés	36
4.1.4 Szén nanocsövek előállítása.....	36
4.2 Biokompozitok előállítása	37
4.2.1 Reakciócentrum fehérje rögzítése szén nanocsövekhez.....	37
4.2.1.1 Fizikai szorpció	37
4.2.1.2 Kémiai rögzítés.....	38
4.2.2 Tormaperoxidáz enzim rögzítése szén nanocsövekhez.....	44
4.2.2.1 MWCNT/HRP komplex előállítása.....	44
4.2.2.2 A MWCNT/HRP komplex-szel borított ITO elektród elkészítése...	44
4.3 Vizsgálati módszerek.....	46
4.3.1 Egyensúlyi abszorpciómérés.....	46
4.3.2 Az abszorpcióváltozás mérése	46
4.3.3 Az adatok kiértékelése	48

4.3.4 Fluoreszcencia mérések	48
4.3.5 Az enzimaktivitás meghatározása	50
4.3.6 Ciklikus voltammetria	51
4.3.7 Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)	52
4.3.8 Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)	52
4.3.9 Atomerő mikroszkópos vizsgálatok (AFM).....	52
5. Eredmények és kiértékelésük.....	53
5.1 CNT/RC kompozitok jellemzése	53
5.1.1 Fizikai szorpció	54
5.1.1.1 A hőmérséklet hatása a nanokompozit stabilitására	54
5.1.1.2 Az előállítás során alkalmazott pH hatása a nanokompozit stabilitására.....	60
5.1.2 Kémiai kötéssel létrehozott komplexek	64
5.1.2.1 RC kötése aminocsoporttal funkcionált többfalú szén nanocsőhöz szulfo-SMCC keresztkötőszerezrel.....	64
5.1.2.2 RC kötése aminocsoporttal funkcionált többfalú szén nanocsőhöz karbodiimid keresztkötőszerezrel	67
5.1.2.3 RC kötése karboxilcsoporttal funkcionált többfalú szén nanocsőhöz karbodiimid keresztkötőszerezrel	69
5.1.2.4 RC kötése szén nanocsőhöz nikkel komplexen keresztül	72
5.1.2.5 A különböző kémiai kötésekkel létrehozott szén nanocső/RC komplexek aktivitásának összehasonlítása.....	74
5.1.3 ITO/MWCNT/RC elektród preparálása	76
5.1.3.1 RC és szén nanocső rögzítése ITO felületére keresztkötőszerekkel. 76	
5.1.3.2 RC és szén nanocső rögzítése ITO felületére vezető polimeren keresztül	79
5.2 Szén nanocső/tormaperoxidáz enzim kompozitok.....	81
5.2.1 Az enzim aktivitása oldatban	82
5.2.2 HRP kötése amino- és karboxilcsoporttal funkcionált szén nanocsőhöz....	86
5.2.3 A MWCNT/HRP komplex enzimaktivitása.....	87
5.2.4 A ITO/MWCNT/HRP elektród enzimaktivitása.....	90
5.2.4.1 Ciklikus voltammetria	92
6. Összefoglaló.....	94
7. Tudományos megállapítások	98
8. Közlemények	102
9. Köszönetnyilvánítás.....	106
10. Irodalomjegyzék	107

Rövidítések jegyzéke

AFM	atomerő mikroszkóp (Atomic Force Microscopy)
AH ₂ , AH [•]	tormaperoxidáz katalitikus ciklusának elektrondonor szubsztrátja és gyökös reakcióterméke
AR	amplex red
ATP	adenozin-trifoszfát
Bfeo	bakteriofeofitin
Bklo	bakterioklorofill monomer
CCVD	katalitikus kémiai gőzfázisú leválasztás (Catalytic Chemical Vapor Deposition)
CMNC	kerámia mátrixú nanokompozitok (Ceramic Matrix NanoComposites)
CNT	szén nanocső (Carbon NanoTube)
DMSO	dimetil-szulfoxid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FTIR	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
fu	felülúszó
GTA	glutáraldehid
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HiPCO	nagynyomású szén monoxid átalakítás (High Pressure CO conversion)
His170	170. hisztidin a polihisztidin láncban

HRP	tormaperoxidáz enzim (HorseRadish Peroxidase)
ITO	indium-ón-oxid
k_{AP}	a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ töltésrekombináció sebességi állandója
k_{BP}	a $P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$ töltésrekombináció sebességi állandója
L, M, H	a bakteriális reakciócentrum fehérje alegységei (light, middle, heavy)
LDAO	N,N-Dimetil-dodecil-amin-N-oxid oldat, detergens
LHs	(Light Harvesting) fénygyűjtő komplexek
LOD	kimutatási határ (Limit Of Detection)
MMNC	Fém Mátrixú Nanokompozitok (Metal Matrix NanoComposites)
MWCNT	többfalú szén nanocső (MultiWalled Carbon NanoTubes)
NHS	N-hidroxiszukcinimid
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia (Nuclear Magnetic Resonance)
NTA	$N\alpha, N\alpha$ -bis(karboximetil)-L-lizin
$NTA \cdot Ni^{2+}$	nikkel és nitrilotriecetsav komplexe
OD	optikai sűrűség (optikai denzitás)
P, P^+ , P^*	alapállapotú, oxidált, gerjesztett bakterioklorofill dimer, elsődleges vagy primer donor
PBS	foszfát pufferolt fiziológiás sóoldat
PDDA	Poli(diallil-dimetil-ammónium-klorid)
pI	izoelektromos pont
PMNC	polimer mátrixú nanokompozitok (Polymer Matrix NanoComposites)
PPy	polipirrol

PTAA	poli(3-tiofén ecetsav)
Q _A	elsődleges vagy primer kinon, első stabil elektronakceptor
Q _B	másodlagos vagy szekunder kinon, másodlagos elektronakceptor
Q _x	500-630 nm közötti abszorpciós sáv
Q _y	650-950 nm közötti abszorpciós sáv
<i>Rb.</i>	<i>Rhodobacter</i>
RC	fotoszintetikus reakciócentrum fehérje
SEM	pásztázó elektronmikroszkóp (Scanning Electron Microscope)
SWCNT	egyfalú szén nanocső (Single-Walled Carbon NanoTubes)
szulfo-SMCC	szulfo-szukcinimidil, 4-(N-maleimidometil)ciklohexán-1-karboxilát
TCOs	áttetsző vezető oxidok (Transmitting Conductive Oxides)
TEM	transzmissziós elektronmikroszkóp (Transmission Electron Microscopy)
TL	TL-puffer (10 mM TRIS; 100 mM NaCl; 0,03 % LDAO; pH 8,0)
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol
XPS	röntgen fotoelektron spektroszkópia (X-ray Photoelectron Spectroscopy)

1. Bevezetés

Az emberiség számára legbőségesebben rendelkezésre álló energiaforrás a napenergia, amelynek hasznosítását a növények, algák és cianobaktériumok végzik a fotoszintézis során, mégpedig az energia redukált szénként történő raktározásával (Milano és mtsai., 2012). Ez a folyamat biztosítja a föld energiaigényeit az élővilág kialakulása óta és azóta is kiszolgálja az egyre növekvő fogyasztást a fosszilis energiahordozókban ősidők óta tárolt energia formájában. Túlzott kitermelése az utóbbi években számos olyan problémát okozott, mint az éghajlatváltozás, a környezet szennyezése, politikai összetűzések és a készlet nem megfelelő felosztása. Ezek megoldása érdekében a kutatók hatalmas figyelmet fordítottak az alternatív energia hasznosítás új útjainak keresésére, melyek lehetővé teszik az energia tárolását és átalakítását. Az egyik legígéretesebb lehetőség ezek közül a napenergia, hiszen bőségesen rendelkezésre áll, mindenhol elérhető (ha nem is egyenletes tér- és időbeli eloszlásban) és biztonságos. A fotoelektromos hatás felfedezése óta (Becquerel, 1839) a kutatók igyekeznek olyan módszereket kidolgozni, amelyekkel képesek a napfény energiájának hatékony befogására és felhasználható ill. tárolható formába történő átalakítására.

Napjainkban intenzív kutatások folynak a biológiai rendszerek technikai alkalmazásai terén, amelynek fő oka, hogy rendkívül hatékonyan, nagy érzékenységgel és specifitással működnek. Ezek a biológiai anyagok azonban csak természetes környezetükben működnek nagy hatékonysággal, mesterséges körülmények között megfelelő környezetet kell számukra biztosítani. Erre a célra létrehozhatók olyan ún. (bio)kompozit anyagok, melyekben az idegen környezet ellenére is lehetséges olyan jól szabályozott körülményeket biztosítani a vizsgálni kívánt biológiai anyagnak, hogy jól megőrizhesse aktivitását. Ebben a rendszerben előnyös tulajdonságaik megtartásával ún. „újgenerációs” eszközökben való alkalmazhatóságuk különös lehetőségét kínálják (pl. integrált optoelektronikai, képalkotó, bioszenzor, energiaátalakító rendszerekben). Az így kapott bionanokompozit hibrideket éppen ezért a jövő anyagainak is szokás nevezni az irodalomban.

Kitüntetett figyelemmel fordulnak a kutatók a fénnel gerjeszthető anyagok, így a fotoszintetikus reakciócentrum fehérje felé is. Habár méretét tekintve a nano tartományba esik (nagysága kb. 10 nm, Nagy és mtsai., 2010) és az általa átalakított energia is a nanoskálán mozog (Wraight & Clayton, 1974), lényegében ez a fehérje biztosítja a bioszféra számára szükséges energiát. A fehérjének több olyan tulajdonsága is van, ami a gyakorlati alkalmazás szempontjából figyelmet érdemelhet: a primer töltésszétválasztás kvantumhatásfoka majdnem 100%-os, karakterisztikus fényelnyelése van a közeli infravörös tartományban, a femtoszekundumtól a perces időtartamokig minden nagyságrendben találunk kinetikai komponenseket és redox kapcsolatban lehet a környezetével. Munkám során a tisztított RC-ot különböző kötési módokkal szén nanocsőhöz és indium-ón-oxid (ITO) vezető réteg felületéhez rögzítettem és annak fotokémiai/-fizikai folyamatait, valamint a komplex stabilitását vizsgáltam. A látható tartományban való átlátszóságának köszönhetően egyedülálló lehetőséget jelent az ITO bio-hibrid rendszerekben lévő kompozit elektródok részeként történő alkalmazása.

A különböző típusú (funkcionált vagy funkcionálatlan, egyfalú vagy többfalú) szén nanocsövek különleges fizikai és kémiai tulajdonságaiknak köszönhetően változatos felhasználási lehetőséget nyújtanak. Kutatócsoportunk sikerrel bizonyította, hogy a RC-ot fizikailag kötve a szén nanocsövekhez elektronátmenet jön létre a két anyag között.

Munkám során az volt a célom, hogy a *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* bíborbaktériumból tisztított fotoszintetikus reakciócentrum fehérjéből (RC) és szervesetlen hordozókból fénnel gerjeszthető nanokompozit anyagokat készítsék és azok spektroszkópiai tulajdonságait jellemezzem. A reakciócentrummal szerzett tapasztalatokat felhasználva más redox fehérjével, tormaperoxidázzal (horseradish peroxidase - HRP) is folytattam fluoreszcencia és abszorpciós kinetikai, valamint elektrokémiai méréseket. A peroxidáz enzim igen gyakran használt enzim a H_2O_2 detektálására, mivel képes H^+ -atomok és például xenobiotikumok oxidálására a H_2O_2 jelenlétében, illetve régóta tanulmányozott, valamint jól ismert a szerkezete és működése. Kutatásaim során létrehoztam egy olyan, az enzimfehérje aktivitásán alapuló bioszenzort, amely valós idejű érzékelést tesz lehetővé és kimutatási határa a pM-os tartományba esik.

Mindkét fehérje jól ismert, napjainkban nagyon intenzíven kutatott modellrendszer. A róluk szerzett ismeretek jó alapot adhatnak egyéb fehérjék biotechnológiai felhasználásához.

A disszertációmban a magyarra csak nehézkesen fordítható kifejezések angolul szerepelnek (pl. amplex red).

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Nanokompozitok

A nanokompozitok olyan kompozitok, azaz társított anyagok, amelyekben legalább az egyik összetevő mérete legalább egy dimenzióban a nanométeres tartományba esik ($1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$). A nanokompozitok kutatásának két évtizede tartó töretlen fejlődése óta az anyagtudósok hatalmas erőfeszítéseket tesznek ezen nanohibridek kitűnő szerkezeti és funkcionális tulajdonságainak kutatására és kiaknázására. A 21. század anyagának tekinthetők (Darder és mtsai., 2007; Shoseyov & Levy, 2008) abból a szempontból, hogy olyan egyedi szerkezeti és működési tulajdonságokkal rendelkezhetnek, amelyek a hagyományos kompozitokban nem találhatók meg. Biológiai anyagok (a biológiai szerveződés minden szintjén) is kapcsolhatók ezekhez a nano-szerkezetekhez, mindeközben összetevőik előnyös tulajdonságai nem csak hogy megőrződhetnek, de ezen felül egymást erősítve össze is adódhatnak. Ráadásul, amint egy dimenziójukban eléri a nanométeres tartományt, a fázisok határfelületén végbemenő kölcsönhatások nagymértékben megváltoznak, ha azok előnyösen alakulnak, akár ki is aknázzhatjuk őket. Napjainkban a nanokompozitok új technológiai és üzleti lehetőségeket nyújtanak az ipar minden területén és nem utolsósorban környezetbarátok is lehetnek. Alkalmazási területeiknek gyakorlatilag a fantázia szab határt, felhasználhatók pl. akár heterogén katalizátorként vagy optikai, mágneses és elektrokémiai készülékekben (Aranda és mtsai., 2006).

A nanokompozit anyagok 3 osztályba sorolhatóak aszerint, hogy mátrixukat milyen anyag alkotja. Megkülönböztetünk kerámia mátrixú nanokompozitokat (Ceramic Matrix Nanocomposites - CMNC), fém mátrixú nanokompozitokat (Metal Matrix Nanocomposites - MMNC) és polimer mátrixú nanokompozitokat (Polymer Matrix Nanocomposites - PMNC).

A kerámiáknak jó a kopásállóságuk és magas a hő- és kémiai stabilitásuk, azonban ridegek, emiatt az iparban történő alkalmazásuk csak kis mértékben terjedt el. Hogy ezt kiküszöböljék, jelentős figyelmet fordítottak mechanikai tulajdonságaik javítására. A rugalmasság növelésére olyan „energiaszóró”

komponensek (erősítő szálak, szemcsék) vihetők a mátrixba, amelyek egyrészt a belső feszültségek orientációit irányíthatóvá, tervezhetővé teszik, másrészt áthidaló elemként szolgálnak a repedések továbbnyílásának megakadályozására (Harmer és mtsai., 1992). A kerámia mátrixú nanokompozitok felhasználásának 74%-át az elektronikai, mágneses és optoelektronika teszi ki, 16%-át az orvosi, gyógyszer- és kozmetikumipar, 10%-át pedig az energetikában, a katalízisben és szerkezeti anyagként hasznosítják.

A fém mátrixú nanokompozitok (MMNC) mátrixa lágy fémekből vagy ötvözetből áll, amelybe nanoméretű erősítőanyag van beépítve. Ezek az anyagok ötvözik a fémek és a kerámiák tulajdonságait, azaz a formálhatóságot és a nagy szilárdságot és modulust. A fém mátrixú nanokompozitok előállításánál gyakran alkalmazzák a nagyenergiájú mechanikai ötvözés módszerét. Ennek során a fémes mátrixba (fém részecske belsejébe) nanoméretű kerámia szemcsék építhetők be (Zhang, 2004). Alkalmazásukban nagy potenciál rejlik számos területen, akár a világűrben, autóiparban vagy egyéb szerkezeti anyagokként (Tjong és mtsai., 2004).

A polimer anyagokat széles körben alkalmazzák az iparban egyszerű előállíthatóságuknak, kis tömegüknek és képlékeny természetüknek köszönhetően. Habár rendelkeznek néhány hátránnyal is, mint a kis modulus és szilárdság (a fémekhez és kerámiákhoz képest). Ezen anyagok mechanikai tulajdonságai is javíthatóak erősítő anyagok hozzáadásával. A polimer mátrix jellemzőinek módosítása gyakran szerves-szerves vegyületek beépítésével történik (szerves-szerves hibrid kompozitok), így növelhető a kompozit hő- és ütésállósága és mechanikai szilárdsága (Alexandre & Dubois, 2000). Gyakorlati alkalmazásakor jelentős szerep jut a kompozit elektromos vezetőképességének is, mivel az esetek döntő többségében fontos az elektrosztatikus feltöltődés elkerülése. Ezen kívül jellemző rá a csekély oxigén-, széndioxid-, nitrogén- és vízgőz-áteresztő képesség (Fischer, 2003).

A nanokompozitok jellemzésére gyakorlatilag minden klasszikus szerkezet és funkció vizsgálati módszer (ami a makroszkópikus rendszerekre alkalmazható) használható. Azonban vannak technikák, amelyeket kifejezetten a nanorendszerek vizsgálatára specializáltak, ilyenek például az atomerő mikroszkópia (AFM), Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR), röntgen fotoelektron

spektroszkópia (XPS), mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) vagy a pásztázó és transzmissziós elektronmikroszkópia (SEM/TEM), stb.

2.1.1 Bionanokompozitok

Az élő szervezetek olyan természetes nanokompozitok előállítására képesek, amelyek szerves és szervetlen összetevők csodálatos hierarchikus elrendeződését mutatják a nanomérettől egészen a makroszkópikus méretekig. A gyöngyökben és kagylókban található gyöngyház (Li és mtsai., 2004), a csontok (Peterlik és mtsai., 2006) és a fogakban található dentin és zománc (Cuy és mtsai., 2002) tökéletes példák a természetben fellelhető bionanokompozitokra.

A bionanokompozitok egyik méltán figyelmet érdemlő alkalmazási területe az orvostudomány, mivel biokompatibilisek is lehetnek, és értelemszerűen a kis méret jellemző rájuk, így jól használhatóak például a gyógyszer hatóanyagokat a szervezetbe juttató rendszerekben. Érdemes megjegyezni, hogy léteznek újabban multifunkciós bionanokompozitok is, amelyek pl. egyidejűleg tartalmazhatják a mágneses nanorészecskéket, a választott szállítandó hatóanyagot és a biokompatibilis, lebontható polimert egyszerre.

Az enzim-alapú bionanokompozitokban a szervetlen rész általában védelmező szerepet tölt be, így megvédve az immobilizált biomakromolekulát a denaturációtól, de ezen kívül több funkcióval is ellátja a hibrid rendszert (Forano és mtsai., 2006). Az enzimek szervetlen hordozóval történő párosítása alternatívaként szolgál az általában enzimek rögzítésére használt módszerekhez képest, olyan hibrid anyagokat eredményezve, amelyek hasznosak pl. a bioszenzorok és enzimatis reaktorok fejlesztése során.

2.2 Fotoszintetikus rendszerek fényenergia hasznosítása

A ma ismert élet kialakulása nagy részben a fotoszintézisnek köszönhető, amely során a növények, algák és fotoszintetizáló baktériumok a fényenergiát

kémiai energiává alakítják (Clayton & Sistrom, 1978). A fotoszintetizáló szervezeteket két csoportba sorolhatjuk. Amikor a fotoszintézis a levegő jelenlétében zajlik le, oxigenikus (Ort & Yocum, 1996), minden más esetben anoxigenikus fotoszintézisről beszélünk (Blankenship és mtsai., 1995). A magasabb rendű növények, algák és cianobaktériumok oxigenikus fotoszintézist végeznek, melynek során a szén-dioxidot szerves szénvegyületekké redukálják, a vizet oxidálva pedig molekuláris oxigént állítanak elő. Néhány fotoszintetikus baktérium, mint például a bíborbaktérium, anoxigenikus fotoszintézise során nem történik meg a víz oxidálása, a szén-dioxid redukciójához szükséges elektront ezek az élőlények más szerves anyagokból nyerik.

A fotoszintézis első lépése a fény fotonjának abszorpciója a fénygyűjtő komplexek (light-harvesting complexes - LHs) segítségével, majd a gerjesztési energia átadása a fotoszintetikus reakciócentrum fehérjéknek, ahol megtörténik az elsődleges töltésszétválasztás, majd a szétválasztott töltések stabilizálódása (Fleming & van Grondelle, 1994).

A bíborbaktérium fotoszintéziséért felelős egysége nanométeres nagyságrendű és az intracitoplazmatikus membránba ágyazva helyezkedik el. Két típusú pigment-protein komplex építi fel, mégpedig a RC és a LHs (Kaplan & Arntzen, 1982). Ez az egység felelős az elektronok és protonok ciklikus áramlásáért a membrán két oldala között, a napenergia által történő gerjesztésének köszönhetően. Az így kialakuló pH gradiens biztosítja az ATP szintézisét (Mitchel, 1972). Az elektron- és protontranszport kapcsolata az ATP-szintézissel központi szerepet tölt be a sejtek energetikájában, egyike a legsokoldalúbban bizonyított, legnehezebben támadható elméleteknek a bioenergetikában (mértán kivívva a Nobel díjat Mitchel-nek 1978-ban).

Az elmúlt néhány évtizedben folytatott biokémiai és spektroszkópiai kutatásoknak köszönhetően a következő szerkezeti és működésbeli következtetések vonhatók le a bakteriális szervezetek fénygyűjtésére vonatkozóan:

1. A bakteriális fotoszintetikus membránokat több ezer pigment molekula (bakterioklorofill és karotinoid) alkotja, amelyek nem kovalensen kötődnek a membránokba integrált proteinekhez, így hozva létre jól szervezett pigment-protein komplexeket (Zuber & Cogdell, 1995).

2. Ezek közül a pigmentek közül csak néhány bakterioklorofill (Bklo) vesz részt közvetlenül a szorosabb értelemben vett fotokémiai reakciókban. A legtöbb Bklo fénygyűjtő antennaként működik, az elnyelt napfényt az elektron gerjesztésére fordítja a RC-ban (Emerson & Arnold, 1932).
3. A bíorbaktériumok a fényt főként az 500 nm körüli (karotinoidok) és 800 nm feletti (bakterioklorofilok) hullámhossztartományban abszorbeálják (kiegészítve a növényekét és az algákét).

2.3 Redox proteinek

A redox proteinek olyan enzimfehérjék, melyek olyan folyamatot katalizálnak, amelyben az elektron a redox fehérjén keresztül eljuthat az egyik molekuláról a másikra. Mindegyik ilyen fehérjében fellelhető legalább egy úgynevezett aktív centrum, ahol egy redox aktív molekula található a fehérjéhez kötve. A leggyakoribb redox aktív molekulák (kofaktorok) közé tartoznak a hemek, flavinok vagy redox aktív fémionok, mint például a vas-, réz-, mangánionok. Vannak olyan redox fehérjék, amelyek biológiai membránokba ágyazódva a membrán két oldala között szállítják az elektront.

Az egyik ilyen fehérje éppen a fotoszintetikus reakciócentrum fehérje, amely a napsugárzásból származó energiát használja a membránban zajló elektrontranszfer hajtóerejeként. Munkám során ezzel a redox fehérjével, valamint a tormaperoxidáz enzimmal végeztem vizsgálatokat (ld. később).

2.3.1 A fotoszintetikus reakciócentrum fehérje szerkezete

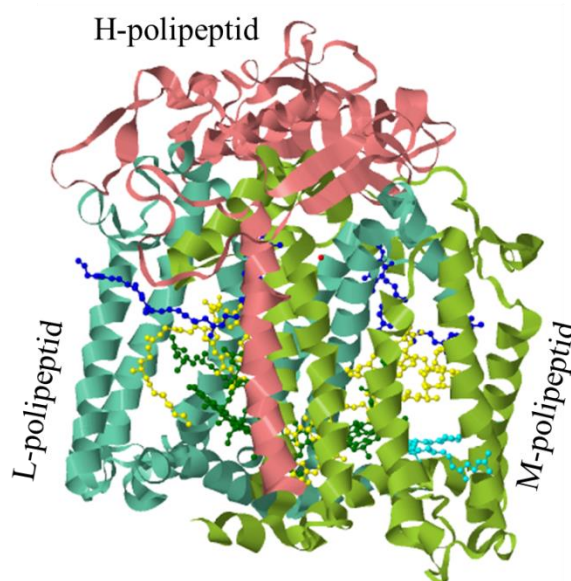
A növényekben, algákban és fotoszintetikus baktériumokban található reakciócentrum fehérje számára, amely a napsugárzásból származó energiát használja a membránban zajló elektrontranszfer hajtóerejeként, egy vagy többféle fénygyűjtő vagy „antenna” pigment-protein szolgáltatja az energiát.

A fotoszintetikus bíorbaktériumokban a fotoszintetikus elektrontranszfer folyamata ciklikus, amelyben részt vesz a reakciócentrum fehérje, a membrán

kinon készlete, egy membránba ágyazott citokróm bc_1 komplex és egy olyan vízzoldékony redox fehérje, mint a citokróm c_2 . A begyűjtött fényenergiát a RC egyrészt a kinon kinollá (dihidrokinon) történő redukciójára fordítja az úgynevezett Q_B oldalon, ami a membrán citoplazmatikus részén található, másrészt megtörténik a citokróm c_2 oxidációja a membrán periplazmatikus oldalán. Mivel a kinon redukció/protonáció és a kinol oxidáció/deprotonáció a membrán ellentétes oldalain megy végbe, a protonok áthelyeződnek a bakteriális citoplazmából a periplazmatikus részre, amelynek során egy elektrokémiai proton gradiens jön létre. Ez a termodinamikai hajtóerő olyan folyamatok, reakciók fenntartására fordítódik, mint például az ATP szintézis.

A *Rhodobacter* (Rb.) *sphaeroides* bíborbaktérium reakciócentruma egy membránba ágyazott pigment-protein komplex, amely 3 polipeptidláncból és 10 kofaktorból épül fel (1. ábra). A polipeptidek közül kettő, nevezetesen az L (light) és M (middle), hasonló szekvenciával rendelkezik, amely a közös evolúciós eredetre utal. Az L- és M polipeptidek C2 szimmetriában helyezkednek el a tengely körül, amely közel merőleges a membrán síkjára és pontos térszerkezetben tartja a kofaktorokat. A H-polipeptid (heavy) egyetlen membránon átnyúló α -hélixszel és egy membránon kívül elhelyezkedő résszel rendelkezik, amely gyakorlatilag fizikailag is lefedti az L- és M-polipeptidek citoplazmatikus oldalát.

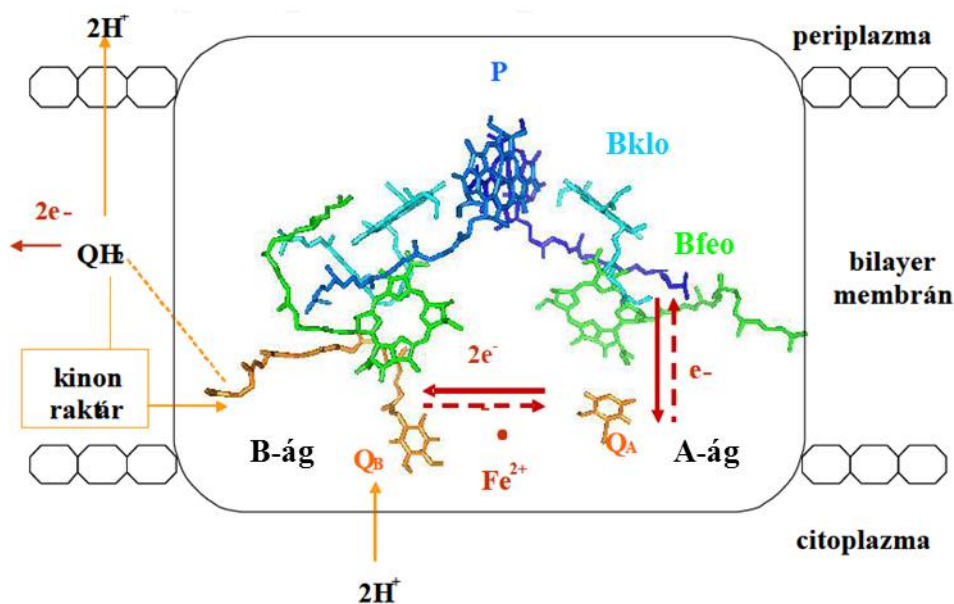
A kofaktorok közé 4 db Bklo (bakterioklorofill), 2 db Bfeo (bakteriofeofitin), 2 db ubikinon-10, egy karotionid és egy nem-hem típusú vasatom tartozik (2. ábra). A Bklo, Bfeo és a kinon kofaktorok az L- és M-polipeptidek határfelületén, kettő membránon átnyúló ágon rendeződnek el, amelyek szintén C2 szimmetriát mutatnak. Kettő Bklo dimert képez a membrán periplamához közeli oldalán, elkülönülve a szomszédos vizes fázistól az L- és M-polipeptidek felszín közeli héliceinek köszönhetően. Mellette kettő Bklo monomer helyezkedik el a két oldalon. Ezeket kettő bakteriofeofitin (Bfeo) és 2 kinon (Q_A és Q_B) követi.



1. ábra A *Rb. sphaeroides* bíorbaktérium fotoszintetikus reakciócentrumának fehérjealegység szerkezete. A különböző alegységeket más-más színnel jelöltem, ahogyan a felirat is mutatja. Az ábrát a brookhaveni Protein Data Bank (www.rcsb.org) 1PST.pdb adatállomány alapján JSmol programmal készítettem. A 10 kofaktort (gömbök) az L- és M-polipeptidekből (kék és zöld csavar) összeálló 'állvány' tartja a helyén. Az alegység- és kofaktorszerkezetet a következő színkódolás jelöli: Bklo, zöld gömb; Bfeo, sárga gömb; kinon, kék gömb; karotenoid, türkiz kék gömb. A vasatom közepén helyezkedik el és piros gömb jelöli.

A vasatom a két kinon között helyezkedik el a szimmetriatengelyen és szerepe főleg szerkezeti. A kinonok a fehérjéhez a membrán citoplazmatikus oldalához közeli részén kötődnek, de elszigetelődnek a szomszédos vizes fázistól az L- és M-polipeptideknek, valamint a H-polipeptid citoplazmatikus részeinek köszönhetően. Ennek az elszigetelődésnek egyik lehetséges oka a kinonok és a citoplazmában lévő redox centrumok között bekövetkező nemkívánatos redox reakciók megakadályozása (Moser és mtsai., 1992).

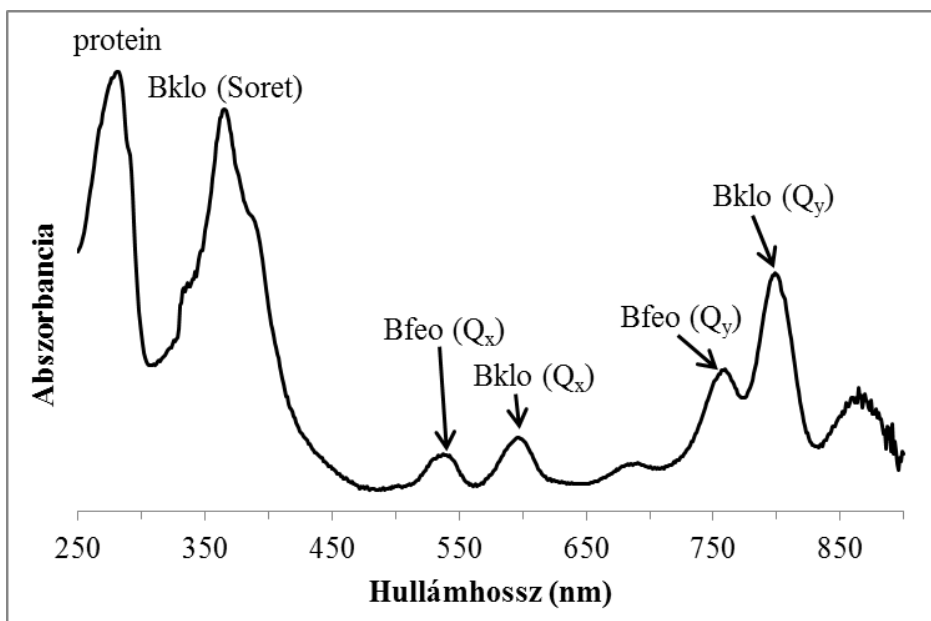
A 2. ábrán látható A- és B-ágként jelzett útvonalakat szokták aktív és inaktív ágaknak is nevezni.



2. ábra A kofaktorok elrendeződése, valamint az elektrontranszfer (piros nyilak) és protonációs folyamatok (narancssárga nyilak) irányai a fotoszintetikus reakciócentrumban. A folytonos nyilak az előremenő, a szaggatott nyilak a töltésrekombinációs folyamatok irányát jelölik (Füvesi, 2007; Rinyu, 2007).

2.3.1.1 A *Rb. sphaeroides* reakciócentrum spektroszkópiája

Elektronszerkezetüknek köszönhetően a Bklo és Bfeo kofaktorok fényelnyelése három abszorpciós sávban helyezkedik el, ezek az úgynevezett Soret (300-420 nm), a Q_x (500-630 nm) és Q_y (650-950 nm) sávok. A tulajdonságok leegyszerűsítve a 3. ábrán láthatók, ahol azt is megmutatom, hogy az egyes kofaktorokhoz mely abszorpciós maximumok tartoznak. A Q_y régióban található kiugró csúcsokhoz tartozó moláris abszorpciós együttható segítségével meghatározható a RC koncentrációja. A spektrum egy másik rendkívül hasznos jellemzője, hogy meghatározható a komplex tisztasága a fehérjéhez tartozó 280 nm-es és a Bklo-hez tartozó 802 nm-es csúcs hányadosából. A gyakorlatban a kísérletekhez az 1,3 és az alatti értékekkel rendelkező RC preparátum tisztasága megfelelő (Okamura és mtsai., 1974). A RC szerkezeti és funkcionális tulajdonságai a spektrum karakterisztikus változásainak követésével értékelhetőek (Hughes és mtsai., 2006).



3. ábra A *Rb. sphaeroides* bíborbaktériumból tisztított RC abszorpciós spektruma

2.3.1.2 Egyszeri töltésszétválasztás

A reakciócentrum felelős a napfényből érkező energia felhasználásáért, amelyet a fotoszintetikus membrán két oldala közötti proton gradiens kialakítására fordít. Ezt a folyamatot a citokróm *bc_L* komplex-szel együttesen katalizálja. A fényenergiát elsősorban a Bklo és a karotinoid pigmentek gyűjtik be és a pigment molekula gerjesztett állapotaként tárolják.

A fotokémia a reakciócentrumban a Bklo dimer gerjesztett állapotba kerülésével indul (P^*), melynek köszönhetően képes elektront donálni a szomszédos Bklo-nak. Ez a folyamat hozzávetőlegesen 3 ps alatt lejátsszódik. Az elektron ezután kb. 1 ps alatt halad át a bakteriofeofitinre, majd kb. 200 ps alatt a Q_A elsődleges kinonra ($P^+BfeoQ_A^-$) és kb. 200-400 μs alatt a Q_B másodlagos kinonra ($P^+BfeoQ_AQ_B^-$). A Q_A egy, míg a Q_B kinon két elektronnal redukálható ki teljesen. A másodlagos kinon egy elektron felvétele után szemikinonná alakul, majd a második elektron felvétele után két protont is megköt a vizes fázisból és dihidro-kinon (kinol) jön létre. A kinol ezután leválik a kinonkötőhelyről és az elektronokat a citokróm *bc* komplexhez szállítja. Helyére a membrán kinon készletéből egy új, oxidált Q_B kötődik (Fehér és mtsai., 1989; Paddock és mtsai., 1994). A ciklikus elektrontranszport befejező lépése az elektron visszakerülése az oxidált P-re. Ezt egy vízőldékony elektrontranszfer molekula, a citokróm *c₂*

közvetíti a citokróm *bc* komplexről, így töltve be az elektronmediátor szerepét a két komplex között a membrán periplazmatikus oldalán (Wraight, 2004; Nagy és mtsai., 2010). Az elektron a Q_B -ról a P^+ -ra kb. 95%-os valószínűséggel a Q_A -n keresztül jut vissza (indirekt út), a fennmaradó 5%-ban közvetlen töltérekombináció történik a fehérjemátrixon keresztül.

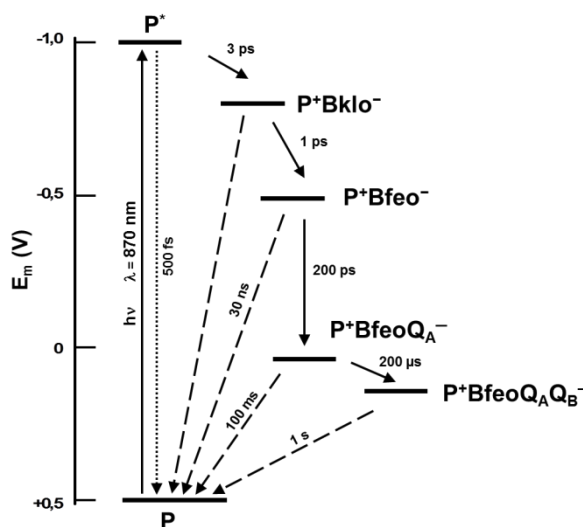
Fiziológias körülmények között csak a kofaktorok A-ága aktív a membránon átnyúló elektrontranszfer során, habár kimutatták, hogy mutáns RC-okban lehetséges részleges elektrontranszfer a B-ágon is (Wakeham & Jones, 2005; Kirmaier és mtsai., 2005).

A töltésmozgás a reakciócentrumban rendkívül hatékony, mivel majdnem minden létrejött P^* állapot létrehoz egy $P^+Q_B^-$ töltéspárt. Ahogy az a 4. ábrán is látható, az elektrontranszfer előremenő reakciói (fekete nyilak) jóval gyorsabbak, mint például a töltéspárok alapállapotra történő rekombinációja (szaggatott nyilak) (Nelson és mtsai., 2009).

Az elektrontranszfer 3. lépése, a $P^+B_{feo}Q_A^-$ töltéspár keletkezése kb. 200 ps alatt következik be, vagyis ez a folyamat jóval lassabban játszódik le, mint a megelőző kettő. Ennek oka, hogy az elektrondonor és -akceptor között nagyobb a távolság, mint a kezdeti lépéseknél. Itt a B_{feo} és a kinon között nincs direkt kapcsolat, a köztük levő teret a fehérje mátrix tölti ki.

Hogy miért van szükség a fényenergia begyűjtésére az elektrontranszfer hajtóerejeként, arra a fotoszintézis adhat választ, leginkább pedig a különböző elemek redoxpotenciálja. Amikor a P elektromos alapállapotban van, az egy elektron oxidációjához szükséges középponti redoxpotenciálja kb. +450 mV. Ugyanekkor a szomszédos B_{klo} egy elektron redukációjához szükséges redoxpotenciálja kb. -900 mV. Ez azt jelenti, hogy a P dimer nem képes elektront donálni a B_{klo} -nak, így nem alakul ki elektrontranszfer a komplexen belül. Azonban, amikor a P egy 870 nm-es foton elnyelésével gerjesztett állapotba kerül, jelentős változás történik redox tulajdonságaiban is. A P^* igen erős redukálószer és igen nagy negatív redoxpotenciállal rendelkezik (majdnem -1000 mV), amelyet a B_{klo} redukálására fordít, előidézve az elektronáramlást. Amellett, hogy a töltésszétválasztás kvantumhatásfoka 100%-hoz közeli (Wraight & Clayton, 1974), az energia hatásfok is nagy lehet, ha P abszorpciós hullámhosszával történik a gerjesztés. A primer donor alap és gerjesztett állapotának redoxpotenciálja közötti különbség kb. 130 kJ/mol (kb. 1370 mV), amely

egybeesik a 860 nm-es fény által képviselt szabadenergiával (kb. 150 kJ/mol). A ciklikus elektrontranszport befejező lépése az elektron visszakерülése P-re a vízdékony citokróm c_2 által, az oxidált Bklo dimer redukálásával.



4. ábra A *Rb. sphaeroides* RC-ban fény hatására bekövetkező töltéssztévalasztás redoxlépéseinek szabadenergia változásai, és az egyes redox komponensek középonti potenciálja a standard hidrogénelektrod redoxpotenciáljához viszonyítva

2.3.2 A peroxidáz enzim

A peroxidázok az oxidoreduktázok osztályába tartozó enzimek, amelyek a szubsztátok széles körének oxidációját képesek katalizálni hidrogén-peroxid jelenlétében (Dunford, 1991; Smith & Veitch, 1998). Molekulatömegük 17 és 84 kDa között mozoghat, polipeptidláncuk pedig 153-tól akár 753 aminosavból is állhat. Ezek a proteinek általában 10-11 α -hélixet tartalmaznak, míg β -redő-t nem, vagy csak alig. A legtöbb peroxidáz két szerkezeti egységből áll egy hemcsoporttal (ferriprotoporfirin) a hidrofób „zsebében” (Banci, 1997). Az 1992-ben általánosan elfogadott besorolás szerint a peroxidázok két nagy szupercsaládba sorolhatóak, az állati és a növényi peroxidázokéba (Welinder, 1992). A növényi peroxidázok szupercsaládjá további 3 osztályra tagolható. Az eleinte aminosav szekvenciák összehasonlításán alapuló besorolást a későbbiekben a különböző peroxidáz csoportok reprezentatív tagjain végzett röntgen vizsgálatokkal is igazolták. A növényi peroxidázok első csoportja olyan intracelluláris enzimeket tartalmaz, mint az aszkorbát-peroxidáz, élesztő citokróm

c vagy a bakteriális kataláz peroxidázok. Ezek a fehérjék nem tartalmazznak sem diszulfid kötések, sem kalciumionokat. A második osztály szekréciós gomba peroxidázokat tartalmaz. Ennek a csoportnak a legtanulmányozottabb képviselői a lignin és manganáz peroxidáz, amelyek a lignin oxidációjában játszanak szerepet. Ezek monomerikus glikoproteinek 4 diszulfid kötéssel és 2 kalcium kötőhellyel. A harmadik osztályt a szekréciós növényi peroxidázok képviselik. Ezek ugyancsak monomerikus glikoproteinek 4 diszulfid kötéssel és 2 kalcium kötőhellyel, habár a diszulfid kötések elrendeződése és a protein lánc konformációja különbözik ez utóbbi két osztállyal.

A tormaperoxidáz izoenzim C (HorseRadish Peroxidase - HRP) nyilvánvalóan a legismertebb növényi peroxidáz, amely a harmadik csoport modell enzime. Az évek során szerzett adatoknak és tapasztalatoknak köszönhetően használják immuntesztéknél (Song és mtsai., 2010), bioszenzorként (Yao & Hu, 2010; Shan és mtsai., 2010), génterápiánál (Greco és mtsai., 2001) vagy szerves szintéziseknél (Cruz-Silva és mtsai., 2008).

2.3.2.1 A tormaperoxidáz

A torma (*Armoracia rusticana*) egy, a világ mérsékelt éghajlati öveiben főként gyökere miatt, élelmezési célból termesztett évelő növény (5. ábra). Gazdag peroxidázokban, amelyek hem-tartalmú enzimek és hidrogén-peroxidot használnak különböző szerves és szervetlen összetevők oxidálására. A peroxidáz kinyerése a gyökérből ipari méretekben zajlik, mivel kereskedelmi használata igen elterjedt, például klinikai diagnosztikai készletként vagy immunpróbaként.

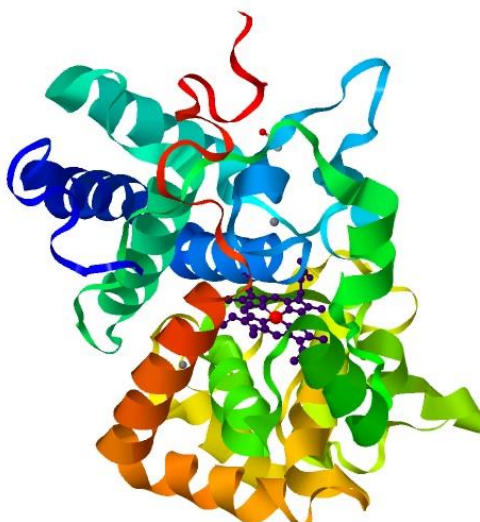


5. ábra A torma növény vázlatos képe (www.fotosearch.com)

A torma gyökere számos különböző típusú peroxidázt tartalmaz, de az izozim C van döntő többségben. A HRP izoelektromos pontja (pI) 9, maximális aktivitása pH 6,0-8,0 között figyelhető meg. Molekulatömege körülbelül 44 kDa. Rendszerint a kilencből nyolc aszparagin karbohidrát kötőhely glikozilált. Az oligoszacharidok stabilizáló hatással vannak az enzimre, megvédik a polipeptidláncot a proteolízistól és a reakciók során képződő szabadgyökök módosító hatásától (Clarke & Shannon, 1976).

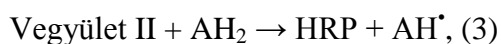
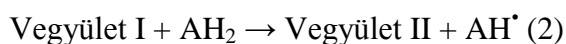
Röntgen vizsgálatok kimutatták, hogy a HRP 308 aminosavból álló polipeptidlánca 13 α -hélixxé és 3 β -redővé csavarodik (Gajhede és mtsai., 1997). A protein konformációját 4 diszulfid kötés stabilizálja. A protein 2 fő részből tevődik össze, a disztálisból és a proximálisból. Mindkettő tartalmaz egy-egy kalcium kötőhelyet (Morishima és mtsai., 1986), ahol a kationokat 7 koordinált kötés tartja a helyükön. A Ca^{2+} szerkezeti jelentőségét számos kísérleti vizsgálat (Howes és mtsai., 2001; Szigeti és mtsai., 2008) és számítógépes szimuláció (Banci és mtsai., 1996) igazolta. Mivel a kalcium kötőhelyek hidrogénkötésekkel kapcsolódnak az aktív részekhez, a Ca^{2+} kötés gyengülése szignifikáns változásokat idéz elő az enzim tulajdonságaiban. A kation disztális kötése gyengébb, mint a proximális. Ez utóbbi megszűnése nagyjából megfelel a HRP katalitikus aktivitását és csökkenti hő- és tárolási stabilitását, valamint stabilitását extrém pH-n. A disztális Ca^{2+} eltávolítása kisebb változásokat generál az enzim 3 dimenziós szerkezetében, míg a teljes kalcium elvonás inaktiválja az enzimet az aktív oldalon történő jelentős konformációs változásoknak köszönhetően (Laberge és mtsai., 2003).

A HRP aktív oldala hemet tartalmaz, ami egy prosztetikus csoport, egy vasatomból és egy protoporfirinből álló komplex (6. ábra). A Fe^{3+} ion 4 koordinált kötéssel rendelkezik a hemen belül és eggyel a proximális His170 imidazol gyűrűjében található nitrogénatommal. Az enzim nyugalmi állapotában a 6. koordinált pozíció szabadon marad, de a szubsztrát katalízis során a H_2O_2 vasatomhoz való kötődésével ez is betöltődik (Berglund és mtsai., 2002).



6. ábra A tormaperoxidáz háromdimenziós szerkezeti képe. A hemcsoport (lila) a centrumban helyezkedik el a vasatommal (piros). Az ábrát a brookhaveni Protein Data Bank (www.rcsb.org) 1H58.pdb adatállomány alapján JSmol programmal készítettem.

A HRP katalitikus ciklusa a következő lépésekből áll:



ahol AH_2 egy elektrondonor szubsztrát, AH^\bullet pedig a gyökös reakciótermék.

Az első lépésben a H_2O_2 -dal történő kölcsönhatásnak köszönhetően 2 elektron távozik az enzimből (a vasatomból és a porfirin gyűrűből). Ennek eredményeként létrejön egy kationos gyök (Vegyület I). Ezután egy elektrondonor két lépésben ferri-enzimmé redukálja a Vegyület I-et és létrejön a Vegyület II. Így ún. ping-pong mechanizmussal megy végbe a szubsztrát átalakulása (a Vegyület I reakcióba lép az első szubsztrát molekulával, létrejön a Vegyület II, ami aztán a második szubsztrát molekulával reagál).

2.4 Szén nanocsövek

Napjainkban egyre többször lehet hallani nanotechnológiai forradalomról. A tudomány fejlődésének köszönhetően mára már a milliméter milliomodrészénél is kisebb méretű elemeket is képesek vagyunk „látni”, sőt manipulálni is tudjuk azokat. Mindez a különböző anyagvizsgálati módszereknek, elsősorban az újgenerációs elektronmikroszkópoknak és pásztázó tűszondás mikroszkópok fejlődésének köszönhető.

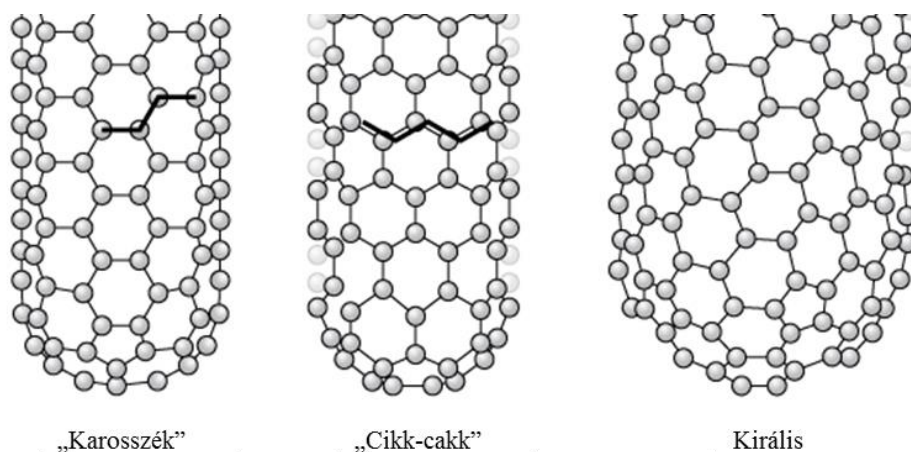
A nanotechnológia területén kulcsfontosságú szerepet töltenek be a szén nanocsövek. Az egyfalú szén nanocső hat szénatomot tartalmazó gyűrűk hálózataából felépülő tökéletes hengerré tekert, egyetlen atom vastagságú grafitréteg. A henger átmérője a nanométeres tartományba esik, vagyis négy nagyságrenddel vékonyabb az emberi hajszálnál. Hosszúságuk akár több tíz- vagy százezerszer nagyobb lehet vastagságuknál.

A szén két korábbról ismert allotróp módosulata mellett (grafit és gyémánt) 1985-ben felfedezték a fulleréneket (Kroto és mtsai, 1985). Ezek előállításánál figyelték meg először a szén nanocsöveket (többfalú szén nanocső, multiwalled carbon nanotubes: MWCNT, Iijima, 1991), majd két évre rá az egyfalú szén nanocsöveket (single-walled carbon nanotubes: SWCNT). A többfalú szén nanocsövek koncentrikusan egymásban elhelyezkedő egyfalú csövekből, hengerpalástokból épülnek fel (Collins és mtsai., 2001). Az egymásba épülő csövek száma 2-től akár több 100-ig is terjedhet, átmérőjük 2 és 20 nm közé esik, a szomszédos falak távolsága pedig közel megegyezik a grafit párhuzamos rétegei közötti van der Waals-távolsággal, ami 0,34 nm.

A szén nanocsövek előállítására legelterjedtebben alkalmazott módszer során valamilyen széntartalmú gázt bontanak katalitikusan (catalytic chemical vapor deposition = CCVD). Az eljárás alatt a katalizátorrészecskék egy hordozóra történő megfelelő ráhelyezésével a létrejövő mintázat akár tervezhető is, például egyenletes sűrűségű "szőnyeg" hozható létre szén nanocsövekből (Fejes és mtsai., 2015).

Az egyfalú szén nanocsövek vége lehet nyitott vagy zárt. Az utóbbi esetben ezek végeit félfullerének zárják le, melyek 6-6 darab öt szénatomos gyűrűt tartalmaznak a görbület miatt. A cső tulajdonságait a henger palástján

hatszögekbe rendeződő szénatomok határozzák meg. Attól függően, hogy hogyan tekerjük fel a grafit síkját, viselkedhet fémként és félvezetőként is. A feltekeredés módját a kiralitási szöggel szokás jellemezni, ami a feltekerés után fedésbe kerülő szénatompárt összekötő vektor irányát jelenti az eredeti hatszöges rácson. Ez alapján megkülönböztetünk nemkirális (karosszék, cikk-cakk) és királis szén nanocsöveket aszerint, hogy a királis szög milyen értéket ($\Theta=30^\circ$, $\Theta=0^\circ$ és $0^\circ < \Theta < 30^\circ$ az előbbi felsorolásnak megfelelően) vesz fel (7. ábra).



7. ábra Egyfalú szén nanocsövek típusai

A szén nanocsövekre jellemző, hogy végüknél már kis feszültség hatására is nagy elektromos térerősség alakulhat ki, ami ezután könnyen szakít ki elektronokat a nanocsöből. Ez a tulajdonság számos eszköznel felhasználható, például lapos kijelzőknél (tévék), vagy hordozható röntgenkészüléknél. Mechanikai tulajdonságaik is egyedülállóak, szakítószilárdságuk például 75-ször nagyobb az acélénál, sűrűségük ugyanakkor csak hatoda az acélénak. Nagy húzófeszültség kifejtésére képesek és nem törékenyek. Ennek következtében jól alkalmazhatóak könnyű, de rendkívül erős anyagok előállításánál. Ezen kívül a legnagyobb hővezető képességű anyagok közé tartoznak a szén nanocsövek.

További fontos tulajdonságuk, hogy annak ellenére, hogy kémiai ellenállóképességük nagy, a felszínükön található hibahelyekre különféle funkciós csoportok ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, stb.) köthetőek.

Biológiai alkalmazásukkal kapcsolatban mai napig nem tisztázott biokompatibilitásuk és citotoxicitásuk. Számos ilyen irányú vizsgálatot elvégeztek már szén nanocsöveken, főként egész sejtekre kifejtett hatásukat vizsgálták

(Magrez és mtsai., 2006). Kisebb biológiai molekulák, fehérjék esetében a szén nanocső megfelelő hordozónak bizonyult.

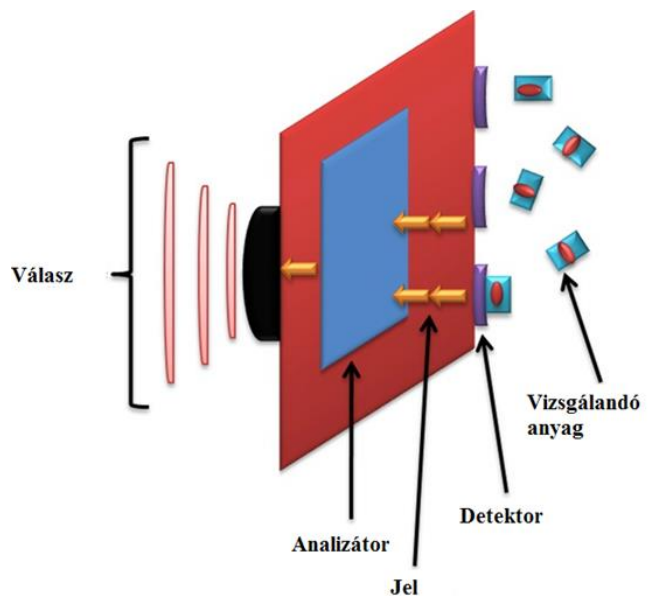
Fotoszintetikus fehérjékkel képzett szén nanocső kompozitok esetén a nanocső jó elektromos vezetési tulajdonságaiból adódóan megfelelő hordozónak bizonyult (Lebedev és mtsai., 2008). Kutatócsoportunk korábbi eredményei is bizonyították, hogy a szén nanocsövek fotoszintetikus reakciócentrummal alkotott komplexei képesek a töltésátviteli állapotok stabilizálására (Dorogi és mtsai., 2006).

2.5 Bioszenzorok

A bioszenzor úgy definiálható, mint az a készülék, amely magában foglal egy biológiai érzékelő elemet, ami egy jelátalakító egységhez kapcsolódik és az észlelt választ mérhető elektromos jellé alakítja, melynek nagysága arányos az analizálandó specifikus anyag (analit) koncentrációjával (8. ábra, Eggins, 1996). A receptor/érzékelő elem típusa szerint a bioszenzor lehet enzimatis bioszenzor, genoszenzor, immunoszenzor, stb. Csoportosíthatjuk a jelátalakító folyamat típusa szerint is, így lehet elektrokémiai, optikai, piezoelektromos és termális vagy kalorimetriás bioszenzor. A számos fellelhető bioszenzor közül az elektrokémiai bioszenzorok igen elterjedtek, sikeresen alkalmazzák őket a kereskedelemben biomolekuláris elektronikai eszközökként (Dzyadevych és mtsai., 2008).

A nanoanyagok hozzájárulnak az elektrokémiai bioszenzorokban alkalmazott enzimelektrodok működésének és stabilitásának javításához. Több módszer is létezik az elektródok előállítására, például a nedves kémiai eljárás, hidrotermális szintézis, szol-gél eljárás, stb.

A létrehozott bionanokompozitok olyan funkciókkal rendelkeznek, amelyek alkalmassá teszik őket elektrokémiai, optikai vagy fotoelektromos készülékek aktív részeként történő használatára.



8. ábra Bioszenzorok általános felépítése (Tapas és mtsai., 2011 alapján)

Számos kihívással kell még szembenézni a bioszenzorok gyakorlati alkalmazása szempontjából. Ha a kereskedelemben beszerezhető készülékeket nézzük, az alacsony költségű bioszenzorok megépítése még mindig létfontosságú. A bioszenzorok fő alkalmazási területe az orvosdiagnosztika, ahol az ilyen készülékek már elérhetőek, de más területeken, mint az élelmiszeripar és ökológia, még mindig kidolgozásra várnak a lehetőségek. A kihívások közé tartozik még az olyan működési feltételek fejlesztése, mint a nagy érzékenység, alacsony kimutatási határ, gyors válasz és ismétlőképesség.

2.5.1 Enzimatis bioszenzorok

Az enzimatis bioszenzorok olyan előnyökkel rendelkeznek, mint a nagy érzékenység, nagy fajlagosság és hosszútávú stabilitás, ami lehetővé teszi a készülék használatát több mérés során is. Ezek a paraméterek szoros összefüggésben állnak a biológiai komponens stabil immobilizálásával. Ismert, hogy az enzimek zárt helyre történő enkapszulációja megakadályozhatja az irreverzibilis szerkezeti deformációkat, így megőrizve harmadlagos szerkezetüket. A szerves hordozók nyitott/pórusos szerkezetének köszönhetően a szubsztrát és az immobilizált enzim közötti transzportnak szabad útja van, csakúgy mint a reakciótermékek kijutásának a külső közegbe. Mindemmellett védő mátrixként is

szolgálnak a mikrobiális bomlás ellen, megőrizve a biológiai elem enzimaktivitását. Az egyik legelső munka McLaren és Peterson nevéhez fűződik 1961-ben, amikor is leírták a lizozim, laktoglobulin, pepszin és a kimotripszin immobilizációját a montmorillonit réteges szilikát rétegek közötti terébe, a direkt interkaláció folyamatát követve (McLaren & Peterson, 1961).

Széles körben alkalmazzák a gyakorlati életben az enzim-alapú elektrokémiai bioszenzorokat az egészségügyben, élelmiszereknél és a környezeti monitoring során. Főként az egészségügyben terjedt el a bioszenzorok használata, ahol például a glükóz bioszenzort a vér glükóz szintjének és a cukorbetegség ellenőrzésére alkalmazzák.

2.5.1.1 Enzim immobilizálási módszerek

Ahhoz, hogy egy működőképes bioszenzort hozzunk létre, a biológiai elemet úgy kell hozzákötni a jelátalakító egységhez, hogy annak enzimaktivitása megmaradjon. Ezt nevezzük az enzim immobilizálásának. A bioszenzorokat általában úgy tervezik, hogy kellő mennyiségű enzimet tudjanak rögzíteni bennük, biztosítva a megfelelő biokatalitikus aktivitást és az enzimeknek alkalmas környezetet nyújtsanak enzimaktivitásuk megtartásához. A lokális kémiai és termális környezetnek jelentős hatásai lehetnek az enzim stabilitására. Az immobilizációs folyamat kiválasztásakor figyelembe kell venni a biológiai elem természetét, a jelátalakító típusát, az analit fizikokémiai tulajdonságait és a bioszenzor megfelelő működtetéséhez szükséges üzemelési körülményeket. Ahhoz, hogy a rögzített biológiai elem a maximális aktivitást mutassa az adott mikrokörnyezetében, ezen feltételek mindegyikének optimálisnak kell lennie (Singh és mtsai., 2008).

Általánosan 4 módszert használnak az enzimek immobilizálására:

1. Adszorpció: Ez a legegyszerűbb és leggyorsabb módja az enzimek rögzítésének. Az adszorpció 2 csoportba sorolható: fizikai és kémiai adszorpció. A fizikai adszorpció gyenge és főleg van der Waals kötésekkel valósul meg. A kémiai adszorpció erősebb és kovalens kötések kialakulásával jár. Sok anyag képes az enzimeket adszorbeálni a felületén, például a faszén, agyag, cellulóz, kaolin, szilikagél, üveg vagy kollagén.

2. Csapdázás (entrapment): Ez egy biológiai anyag és egy monomer oldat keverékének felel meg, amelyet aztán gélle polimerizálnak, csapdázva a bioanyagot. Habár ily módon akadályba ütközhet a szubsztrát diffúziója, amely a reakció lelassulásához vezethet. Mindemellett a bioaktivitás csökkenése megtörténhet a gél pórusain keresztül is. Általában poliakrilamidot, keményítő gél, nyilont, vezető polimert stb. használnak.

3. Kovalens kötés: Ennél a módszernél a kötés a bioanyag egy funkciós csoportja és a hordozó mátrix között jön létre. Néhány funkciós csoport, amely alapvetően nem vesz részt az enzim katalitikus aktivitásában, hozzáköthető kovalensen a mátrixhoz. Ehhez olyan enyhe körülményekre van szükség, mint az alacsony hőmérséklet és ionerősség és a fiziológiai tartományba eső pH.

4. Keresztkötés: Itt általában a biológiai anyagot kémiai úton rögzítik a szilárd hordozóhoz vagy más segítő anyaghoz, azaz a keresztkötőszerhez, amely jelentősen megnöveli a kötődés valószínűségét. Ezek az anyagok gátolhatják is az enzimaktivitást, főként nagyobb koncentrációk esetén. Bevált módszer az adszorbeált biológiai anyagok stabilizálására. A leggyakrabban használt bifunkcionális szer a glutáraldehid.

2.5.1.2 Bioszenzorokban alkalmazott nanoanyagok

1. ZnO: Mint nagy tiltott sávval (3,37 eV) rendelkező félvezető, fontos szerepet játszik az optikában, optoelektronikában, szenzoroknál és aktuátoroknál a félvezető, piezoelektromos és piroelektromos tulajdonságainak köszönhetően. Nemrégiben babérlevélszerű ZnO mikrostruktúrákból készítettek H₂O₂ bioszenzort nedves kémiai eljárással (Cao és mtsai., 2008). Az ilyen ZnO mikrostruktúrák, amelyek 8-10 nm-es nanorudakat tartalmaznak, nagy felülettel rendelkeznek, így megfelelő teret biztosítanak a H₂O₂ redukciójának, azzal hogy többlet elektroaktív helyet és megnövekedett elektrokatalitikus aktivitást szolgáltatnak.

2. Arany: Az arany nanorészecskék a bioaktivitásukat megtartó biomolekulák stabil immobilizálására alkalmazhatóak. A redox proteinek és az elektronokat közvetítő felszínek közötti elektron transzfer könnyebben végbemegy, köszönhetően a nagy felület-térfogat aránynak, a magas felületi energiának, a

csökkent protein-fém részecske távolságnak és annak, hogy elektronvezetőként viselkedik a prosztetikus csoportok és az arany nanorészecskén lévő elektron felület között. Az elektródok felülete különféleképpen módosítható arannyal a bioszenzorok működésének optimalizálása céljából (Pingarron és mtsai., 2008). Erre egy példa az acetilkolinészteráz bioszenzor megépítése, amelyben az elektród felületét galvanizálták arany nanorészecskékkal, majd az immobilizált enzimmel elhidrolizálták az acetilkolint (Shulga & Kirchhoff, 2007).

3. Szén nanocső (CNT): Számos új technika fejlesztésénél jutott szerephez a 2.4-es fejezetben már említett szén nanocső. Bioszenzorokban való alkalmazása során például jelentős elektrokatalitikus hatását és nagy elektrontranszfer sebességét figyelték meg az elektroaktív szerkezet és az elektród között. Kutatók kifejlesztettek egy rendkívül érzékeny és szelektív galaktóz bioszenzort, ahol egyfalú szén nanocső (SWCNT) szuszpenziójából és kitozán mátrixból hoztak létre stabil diszperziót. Ezután a glutáraldehid keresztkötőszerezrel rögzítették a galaktóz oxidázt a szabad aldehidcsoportokhoz. A szenzor által detektált oxigén kimutatási határa 25 μM volt (Tkac és mtsai., 2007). A CNT felületének aktiválása alapfeltétel a létrehozott bioszenzor hatékonyságának növeléséhez. A gyakorlatban, mint hordozó mátrix, általában elengedhetetlen a CNT szuszpendálása vizes közegben a proteinek immobilizálásához. Ez történhet a CNT funkcionálásával ionos vagy hidrofil csoporttal vagy vízőldékony polimerekkel (Yan et al., 2008).

4. Polipirrol (PPy): A különböző vezető polimerek közül a polipirrol, mint „intelligens anyag”, fontos szerepet játszik az elektrokémiai bioszenzoroknál az elektrokémiai aktivitás és érzékenység megnövelésénél (Teles & Fonseca, 2008). Ennek oka jó biokompatibilitása, vezetőképessége, stabilitása és hatékony polimerizációja semleges pH-n, valamint könnyű szintetizálhatósága. PPy film könnyen létrehozható elektrokémiai vagy kémiai úton és nagyfokú szelektivitással rendelkezik a rá jellemző méret-kizárási tulajdonságának köszönhetően. Elektrokémiai módszerrel stabil és homogén hibrid film szintetizálható például, amely PPy-ből és réz hexacianoferrátból áll. Így olyan elektrokatalizátor állítható elő, amely H_2O_2 -t redukál Na^+ vagy K^+ ionok jelenlétében (Fiorito és mtsai., 2006).

2.5.1.3 H₂O₂ bioszenzorok

A hidrogén-peroxid igen erős oxidálószer, amelyet élelmiszerekben általában antimikrobiális tulajdonsága miatt, a tej és gyümölcsleveket tartalmazó aszeptikus csomagolásokban pedig sterilizáló hatása miatt alkalmaznak. Ennek ellenére a H₂O₂ használata nem teljesen biztonságos, mivel túladagolás esetén életveszélyes neurológiai reakciókat válthat ki, és károsíthatja a felső gyomor-bél traktust (Humberston & Krenzelok, 1990). Éppen ezért jelenlétének és mennyiségének gyors és megbízható nyomonkövetése igen fontos, és új technikák kidolgozását igényli. Detektálására alkalmas lehet a fluoreszcencia, spektrofotometria, elektro-kemilumineszcencia vagy az elektrokémia módszere.

A H₂O₂ szenzorok alapvetően két csoportra oszthatók, az enzimatis és a nem-enzimatis szenzorokra. Léteznek olyan nem enzimatis bioszenzorok amelyben pl. MnO₂ hibridet használnak érzékelőanyagként, amelyet kémiai úton rögzítenek grafénhez és szén nanocsőhöz egy áttetsző szén elektród felületén. Ez a szenzor igen magas elektrokatalitikus aktivitással rendelkezik a H₂O₂ oxidációját tekintve, kimutatási határa pedig optimális körülmények között 0,1 µM körüli (Daixin és mtsai., 2013). Egy másik, a számos lehetőség közül, amikor Ag nanorészecskéket galvanizálnak az ionos folyadékkal funkcionizált többfalú szén nanocsővel módosított áttetsző szén elektród felületére. A módszer kimutatási határa 3,9 nM (Xiaoyan és mtsai., 2013).

Az enzimatis elektródoknál, hasonlóan az előző módszerhez, az említett módosított elektródhoz Ag helyett citokróm *c*-t kötöttek. Amperometriás módszerekkel ellenőrizték az enzim biokatalitikus aktivitását a hidrogén-peroxid felé és a kutatócsoport által mért kimutatási határ 13 nM-nak adódott (Xiuhui és mtsai., 2013). Ugyanakkor a tormaperoxidáz enzim is számos kutatás középpontjában áll, melyek során a legkülönbözőbb módon rögzítik a HRP-t különböző elektródokhoz. Egy ilyen módszer, amikor az enzimet egyfalú szén nanocsőre adszorbeálják, majd egy arany réteggel bevont elektród felületére kovalens kötésen keresztül felvitt L-ciszteinhez rögzítik. Ebben az esetben ugyancsak amperometriás módszerekkel határozták meg a H₂O₂ kimutatási határát, amely 0,21 pM volt (Yanfeng és mtsai., 2012).

3. Célkitűzések

Az SZTE Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézetében Nagy László és csoportja már egy évtizede foglalkozik fotoszintetikus reakciócentrumot tartalmazó nanokompozitok előállításával és vizsgálatával. A csoport munkájába bekapcsolódva először egy diplomamunka keretében vizsgáltam a fotoszintetikus reakciócentrum fehérje stabilitását különböző hordozó felületekre történő szárítását követően. Az SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszékén is régóta foglalkoznak különböző szén nanocső alapú kompozitok szintézisével és vizsgálatával, így egy kollaboráció keretein belül fizikai szorpcióval kötöttem a fehérjét funkcionálatlan szén nanocsőhöz és vizsgáltam a komplex fotokémiai aktivitását. Mivel számos izgalmas kérdés még nyitva maradt, nagy örömmel folytattam a munkát doktori képzés keretében.

Az így szerzett tapasztalatok alapján más, olyan redox fehérjével létrehozott biokompozit tanulmányozására is figyelmet fordítottam, mint a tormaperoxidáz.

Munkám során tehát célul tűztem ki:

1. A fizikai szorpcióval létrehozott SWCNT/RC komplexek stabilitását befolyásoló körülmények (hőmérséklet, preparálás során alkalmazott pH, inkubálási idő) jellemzését és optimalizálását.
2. Olyan kémiai kötési módszerek kidolgozását, amelyek kutatócsoportunk laboratóriumi körülményeihez és a reakciócentrum fehérjéhez adaptálhatók.
 - 2.1. A fotoszintetikus reakciócentrum fehérje kémiai rögzítését amino- és karboxilcsoporttal funkcionált többfalú szén nanocső felületén. A létrehozott kompozitok szerkezeti karakterizálását (EM) és fotoaktivitásuknak meghatározását flashfotolízis kísérletekkel.
 - 2.2. A fotoszintetikus reakciócentrum fehérjéből és szén nanocsőből létrehozott komplex kémiai úton való rögzítését ITO felületéhez, a kompozitok szerkezeti meghatározását (SEM) és a RC fotokémiai/-fizikai aktivitásának meghatározását a különböző kötési eljárásokat követően (flashfotolízis kísérletek).

3. Tormaperoxidáz enzimaktivitásának és H_2O_2 kimutatási határának meghatározását gvakol és amplex red hidrogén donorok hozzáadásával, abszorpciókinetikai és fluoreszcenciás módszerekkel.
 - 3.1. A tormaperoxidáz enzim kémiai rögzítését amino- és karboxilcsoporttal funkcionált többfalú szén nanocső felületén. A létrehozott komplexek aktivitásának ellenőrzését fluoreszcencia mérésével.
 - 3.2. A tormaperoxidázból és karboxil-funkcionált MWCNT-ből létrehozott kompozit szerkezeti karakterizálását (AFM) és enzimaktivitásának valamint H_2O_2 kimutatási határának meghatározását fluoreszcencia mérésével.
 - 3.3. Enzimelektród létrehozását a szén nanocső/tormaperoxidáz enzim komplex kémiai rögzítésével ITO felületére. A létrehozott elektród szerkezeti karakterizálását (SEM), enzimaktivitásának valamint H_2O_2 kimutatási határának meghatározását fluoreszcencia mérésével és aktivitásának ellenőrzését ciklikus voltammetriával.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Mintaelőkészítés, preparatív eljárások

4.1.1 A *Rhodobacter sphaeroides* baktériumtörzs tenyésztése

Vizsgálataim során a *Rb. sphaeroides* bíborbaktériumból tisztított R-26 és 2.4.1. baktériumtörzseket használtam. Az R-26 törzs karotinoidmentes, azaz abszorpciós spektrumából hiányoznak a karotinoidok sávjai, ezért folyadékkultúrájának színe jellemzően kék, míg a vad típusú tenyészet színe vöröses barnás. A 2.4.1. törzs reakciócentruma rendelkezik karotinoiddal a vad típusúhoz hasonlóan, amely védelmet nyújt a fehérje komplexnek a fotooxidációval szemben, ezért a kísérleteinknél ezt a törzset tekinthetjük vad típusúnak. A karotinoidot nem tartalmazó R-26 törzs sejtei ftoheterotróf körülmények között nevelkedtek, mivel érzékenyek a tápoldat oxigénkoncentrációjára.

A folyadékkultúrákhoz 1,5%-os agaron növesztett masszív szúrt tenyészetekből vettünk mintákat és átoltottuk a 20-25 cm³ szukcinát-tartalmú Siström-tápoldatot tartalmazó, jól zárható csiszoldugós kémcsövekbe. A továbbtenyésztéshez 200-250 cm³, majd 1000 cm³-es üvegeket használtunk. A sejteket minden egyes átoltás után 4-6 órára sötétben tartottuk, hogy az oldatban lévő összes oxigént felhasználják. Erre azért volt szükség, mert ftoheterotróf nevelési körülmények között a tápoldatban maradt kismennyiségű oxigén is képes a sejtek egy részét elpusztítani, lassítva ezzel a tenyészet növekedését. A sötét szakaszt követően a tenyészeteket fényasztalra tettük. A megfelelő megvilágítást 40 W teljesítményű wolfram izzószálas lámpák biztosították, amelyeket kb. 20 cm-re helyeztünk el a tenyészetektől, így az általuk termelt hő egyúttal biztosította az optimális, kb. 30 °C-os hőmérsékletet is. A 4-5 napig tartó folyamatos megvilágítást követően a sejteket lecentrifugáltuk (20 perc, 6000 × g), majd mosópufferrel (10 mM TRIS; 100 mM NaCl) mostuk és a felhasználásig -20 - -25 °C-on tároltuk lefagyasztva (Nagy és mtsai., 1991). Literenként átlagosan 8 gramm baktériumtömeget tudunk összegyűjteni.

4.1.2 Reakciócentrumok preparálása

A reakciócentrumok preparálásához nagyobb mennyiségű, kb. 100 g vizes tömegű sejtre volt szükség, amelyeket a preparálás előtt többször átmostunk TRIS-pufferrel (10 mM TRIS; 100 mM NaCl; pH 8,0). Hígítás után ultrahanggal feltörtük a sejteket. Az ultrahangos feltáráshoz SONOPLUS Ultrasonic homogenizer-t használtunk (Bandelin, Németország). Egy speciálisan a sejtfeltáráshoz tervezett, jégbe állított üvegedényben a készülék TT 13 titánfejét használva 1 órán át közel 100% (kb. 70 W) teljesítménnyel ultrahangoztuk a sejteket impulzus üzemmódot használva (5 impulzus/periódus). A számunkra szükségtelen sejtmarmadványokat (sejtfal, feltörtetlen sejtek) centrifugálással távolítottuk el (10 perc, $40000 \times g$), majd a felülúszót ultracentrifugáltuk (90 perc, $240000 \times g$). Az üledékben kapott kromatofórákat finom ecsettel felszuszpendáltuk és 0,45% LDAO (N,N-Dimetil-dodecil-amin-N-oxid oldat) detergenst tartalmazó TRIS-pufferrel kioldottuk a fehérjéket, amit újabb ultracentrifugálással választottunk el a nem szolubilizált részekről. A felülúszóból a RC-ot frakcionált ammónium-szulfátos kicsapással, majd DEAE Sephacell anioncserélő oszlopkromatográfiával különítettük el. Az oszlopkromatográfia előtt a mintát dializálással sómentesítettük. A sómentesített fehérjeoldatot anioncserélő oszlopra kötöttük, sómentes, majd 60 mM NaCl-ot tartalmazó oszlopmosó pufferrel (10 mM TRIS; 20 μ M EDTA; 0,02% LDAO) mostuk, amíg az eluátum abszorpciós spektruma nem változott. A RC-ot az oszlopról 250 mM NaCl-ot tartalmazó pufferrel (10 mM TRIS; 20 μ M EDTA; 0,1% LDAO) eluáltuk és kistérfogató frakciókat gyűjtöttünk. A kromatográfia során szedett frakciókból azokat tartottuk meg, amelyekben az OD_{280nm}/OD_{800nm} arány (optikai denzitás) 1,4-1,7 között volt. A koncentráció és a tisztaság megállapítása után a reakciócentrum frakciók ismételt dializálása következett TL pufferben (10 mM TRIS; 100mM NaCl; 0,03% LDAO; pH 8,0) a sókoncentráció csökkentése érdekében, majd a reakciócentrumokat $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

4.1.3 Peroxidáz enzim oldat készítés

A tormaperoxidáz enzimből (sómentes, aktivitása 350 Unit/mg, Reanal) 1 μ M-os oldatot készítettem desztillált vízben. Az enzimmel végzett abszorpció és emisszió (fluoreszcencia) spektroszkópai mérések során mindig friss oldatokat használtam, hogy elkerüljem az esetlegesen már korábban oxidálódott anyagok befolyásoló hatását.

4.1.4 Szén nanocsövek előállítása

Az egyfalú szén nanocsöveket Horváth Endre tisztította Forró László laboratóriumában (Institute of Physics of Complex Matter, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Svájc). A kereskedelmi forgalomban is kapható, nagynyomású szénmonoxid prekurból készült (HiPCO) szén nanocsövek tisztítása nedves oxidációs módszerrel történt. A folyamat során 100 mg nyers HiPCO SWCNT-t oxidáltak 60 ml 30%-os H_2O_2 és 110 ml 22%-os HCl elegyével. Az oldatot mágneses keverés mellett 70 °C-on, 9 órán át folyamatos reflux alatt tartották, majd szobahőmérsékletre hűtötték, leszűrték és desztillált vízzel mosták a 7,0-es pH eléréséig. Ezt követően 120 °C-on, 30 percig szárították. A tisztított SWCNT-k hozama 90% volt, amit transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM) segítségével határoztak meg. A csövek átlagos átmérője 1,5 nm, amely jól egyezik azzal az értékkel (1-4 nm), amit Dorogi és mtsai találtak az egyfalú szén nanocsövekre AFM technikával (Dorogi és mtsai, 2006).

A többfalú szén nanocsöveket katalitikus kémiai gőzfázisú leválasztással (CCVD) állították elő forgó csökemence alkalmazásával 720 °C-on, ugyancsak Svájcban. Katalizátorként CaCO_3 -hordozós vas-kobaltot, szénforrásként pedig acetilént használtak nitrogén gázáram alatt (Magrez és mtsai., 2005). A CaCO_3 hordozó alkalmazása azért előnyös, mert megnöveli a többfalú szén nanocsövek szelektív képződését az amorf szénformákéval szemben. A szintézis végeredményeként kapott szén nanocsöveken szennyezőként megmaradt hordozóanyagot és katalizátorszemcséket savas kezelés segítségével távolították el. A tisztítás során a szén nanocsöveket egy éjszakán át 2 M-os sósavban

kevertették, majd szűrték és ioncserélt vízzel pH-semlegesre mosták. A többfalú szén nanocsövek átmérője átlagosan 20-60 nm között mozgott, míg átlagos hosszúságuk a néhány száz nanométertől a néhány mikrométerig terjedt.

4.2 Biokompozitok előállítása

4.2.1 Reakciócentrum fehérje rögzítése szén nanocsövekhez

4.2.1.1 Fizikai szorpció

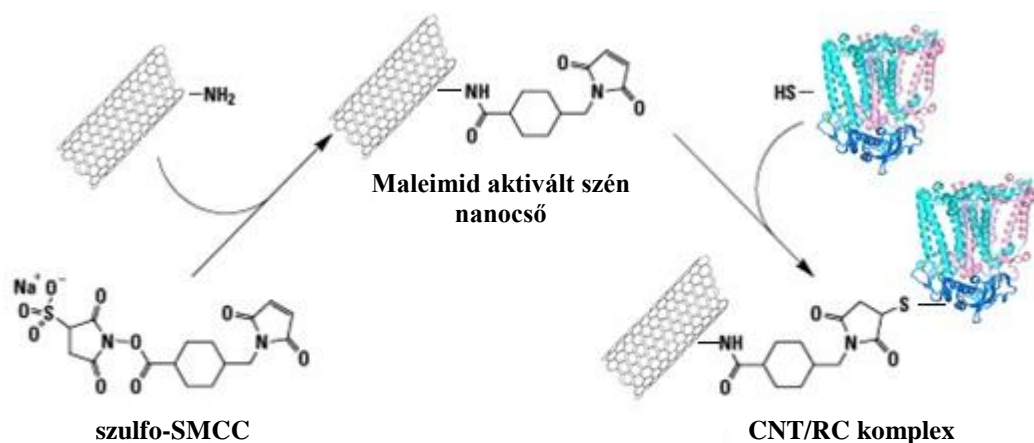
500 μL fotoszintetikus RC-hoz ($c \approx 100 \mu\text{M}$) 25 μL foszfát pufferben (0,1 M; pH 7,0; 0,03% LDAO) szuszpendált funkcionálatlan SWCNT-ot (0,1 mg/mL) adtam. Ezt követően 3 napig dializáltam a mintát 4 °C-on foszfát pufferben (0,1 M; pH 7,0) a detergens eltávolítása érdekében. A mintát homogenizálás céljából naponta rövid ultrahangozásnak vettem alá (vízfürdőben ELMA Transsonic 310 típusú ultrahangozó készülékkel). A dialízis befejezése után a mintát ultracentrifugáltam (4 °C, 15 perc, $130000 \times g$), majd eltávolítottam a felülúszót és az előzővel megegyező összetételű pufferben felsuszpendáltam az üledéket. Ezután az előbbi körülményeknek megfelelően annyszor ultracentrifugáltam és mostam a mintát, amíg a felülúszó abszorpciós spektruma a reakciócentrum csúcsainak jelenlétét már nem mutatta. A felülúszó spektrumát UNICAM UV4 típusú kétsugaras spektrofotométerrel mértem. Utolsó lépésként eltávolítottam a felülúszót, a csapadékhoz pedig 200 μL foszfát puffert (PBS - Phosphate Buffered Saline, 0,1 M; pH 7,0) adtam, majd ultrahangoztam. Ezek után néhány cseppet N_2 -áramban üveglapra szárítottam. A minták egy részét szobahőmérsékleten, a másik részét hidegszobában 4 °C-on, sötétben tartottam. A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten végeztem, függetlenül az inkubációs hőmérséklettől.

4.2.1.2 Kémiai rögzítés

A RC szén nanocsövekhez történő immobilizálása több különböző protokoll szerint történt. A rögzítés módszerének megválasztása függött a szén nanocsövön kialakított funkciós csoporttól, valamint attól, hogy a reakciócentrum mely részét kívántuk a hordozóhoz kötni. Néhány esetben keresztkötőszert alkalmaztam, majd polimeren keresztül hoztam létre komplexet, végül pedig egy elektródot készítettem. A preparálási módszerek lépései minden esetben 4 °C-on zajlottak, de a méréseket szobahőmérsékleten végeztem.

Kémiai kötés szulfo-SMCC keresztkötőszerral:

A szulfo-SMCC (szulfo-szukcinimidil 4-(N-maleimidometil)ciklohexán-1-karboxilát) egy vízzel oldékony keresztkötőszert, amely az amino- és szulfhidrilcsoportok között hoz létre kötést az ellentétes végein elhelyezkedő NHS-észter (amino-reaktív) és maleimid (szulfhidril-reaktív) csoportoknak köszönhetően. Az NHS-észter (N-hidroxiszukcinimid-észter) az elsődleges aminokkal reagálva stabil amid-, a maleimid pedig stabil tioéter kötést hoz létre a szulfhidrillel (9. ábra).



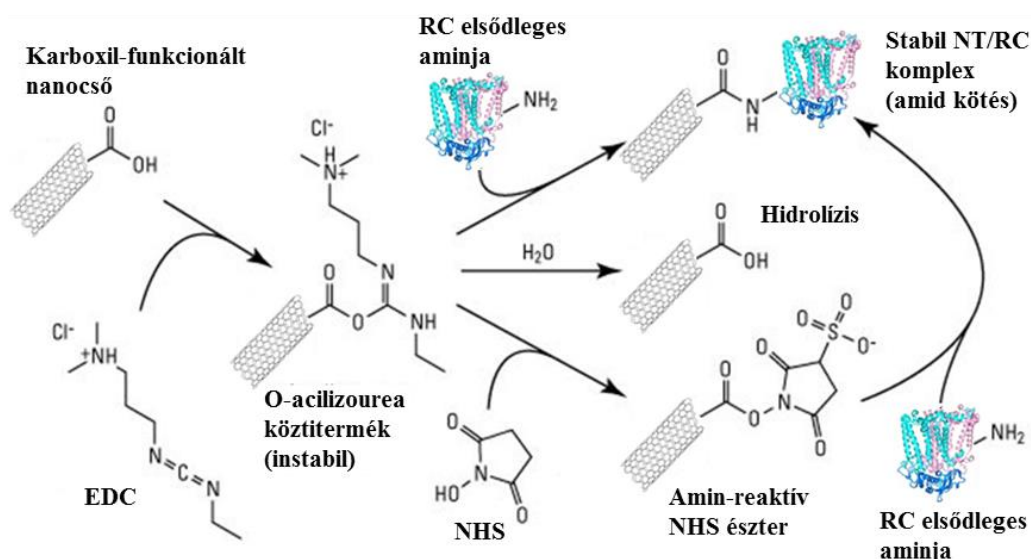
9. ábra A szulfo-SMCC kötés reakcióvázlata

A preparálás protokollja szerint először egy éjszakán át dializáltam 500 μL NH_2 -funkcionált MWCNT szuszpenziót (0,14 mg/mL) foszfát pufferben (0,1 M; pH 7,2; 0,006% LDAO), majd 1 órán át ultrahangoztam, hogy homogén szuszpenziót kapjak. Ezt követően elkészítettem a szulfo-SMCC oldatot (4,5 mM) DMSO-ban (dimetil-szulfoxid), majd hozzáadtam a szén nanocsőhöz és 2 órán át

kevertettem az oldatot, hogy a funkciós csoportokat aktiváljam. Ezután egymással párhuzamosan dializáltam az aktivált szén nanocsövet és az R-26 reakciócentrumot ($c \approx 65 \mu\text{M}$) PBS-ben (MWCNT: 0,1 M; pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,006% LDAO; RC: 0,1 M; pH 7,0; 0,006% LDAO) 2 órán keresztül. Mindezek után egy éjszakán át kevertettem a RC-ot a MWCNT szuszpenzióval. Másnap ultracentrifugáltam a mintát (4°C , 15 perc, $130000 \times g$) és mostam foszfát pufferrel (0,1 M; pH 7,2; 0,006% LDAO), amíg a felülúszó abszorpciós spektruma a reakciócentrumra jellemző csúcsokat mutatta. Az üledéket felszuszpendáltam 500 μL foszfát pufferben (0,1 M; pH 7,2; 0,006% LDAO), majd rövid ideig ultrahangoztam és lefagyasztva, sötétben tároltam.

Kémiai kötés karbodiimid keresztkötőszerezrel:

A vízzel oldékony karbodiimid keresztkötőszerez (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) (EDC) szerepe, hogy aktiválja a karboxil funkciós csoportot, így hozva létre amid kötés az elsődleges aminokkal. Az aktiváláskor egy vizes oldatban nem stabil köztitermék keletkezik (O-acilizourea), amely ha nem lép reakcióba az aminocsoporttal rövid időn belül, elhidrolizál, regenerálva a karboxilcsoportot. Ennek kiküszöbölésére N-hidroxiszukcinimidet (NHS) alkalmaztam a karbodiimiddel, amely az O-acilizourea-nál jóval stabilabb amino-reaktív NHS-észtert képez (10. ábra).



10. ábra AZ EDC és NHS kötés reakcióvázlata

Ez a kötési módszer két esetben alkalmazható. Az első esetben a karboxil-funkcionált szén nanocső aktivált funkciós csoportjához tudjuk a fehérje aminocsoportját rögzíteni. A második eset ennek fordítottja, amikor is a fehérje karboxilcsoportját aktiváljuk és ezt kötjük az amino-funkcionált szén nanocsővekhez. Ez utóbbi esetben a reakciócentrumok funkciós csoportjai egymással is összekötődhetnek, csomókat alkotva, amelyek nehezítik a vizsgálati módszerek eredményeinek értékelését valamint a megfelelő CNT/RC arány megtartását.

Az első esetet tekintve, a fehérje rögzítését megelőzően egy éjszakán át dializáltam 500 μ L többfalú szén nanocső szuszpenziót (0,14 mg/mL) foszfát pufferben (0,1 M; pH 7,0; 0,006% LDAO), hogy a benne maradt esetleges szennyeződésekeltávolítsam. Ezután 1 órán át ultrahangoztam (vízfürdőben ELMA Transsonic 310 típusú ultrahangozó készülékkel), hogy homogén szuszpenziót kapjak. Mindeközben frissen elkészítettem az NHS és az EDC keresztkötőszer oldatokat (100-100 μ L; 0,125 M) desztillált vízben, majd hozzáadtam őket a karboxil-funkcionált szén nanocsőhöz és 2 órán keresztül kevertettem az oldatot, hogy a funkciós csoportokat aktiváljam. Ezt a minta ismételt dializálása követte PBS-ben (0,1 M; pH 7,0; 0,006% LDAO) 2 órán át. Erre azért volt szükség, hogy az oldatban feleslegben jelenlevő keresztkötőszereket és származékaikat eltávolítsam. Ezzel párhuzamosan dializáltam 50 μ L R-26 reakciócentrumot (ideális esetben $c \approx 65 \mu$ M) foszfát pufferben (0,1 M; pH 7,0; 0,006% LDAO), hogy az esetleges szennyeződésekeltávolítsam, illetve a feleslegben lévő detergens mennyiséget eltávolítsam. A detergens koncentrációjának csökkentése azért fontos, mert a molekula méretéből adódóan lefedheti a kötés kialakulásához szükséges funkciós csoportokat, így akadályozva a komplex létrejöttének hatékonyságát. Mindezek után hozzáadtam a RC-ot az aktivált szén nanocső szuszpenzióhoz és egy éjszakán át kevertettem mágneses keverő segítségével. Másnap a fiziszorpcióhoz hasonló protokoll szerint ultracentrifugáltam a mintát (4 °C, 15 perc, $135850 \times g$) és mostam PBS-sel (0,1 M; pH 7,0; 0,006% LDAO), amíg a felülúszó abszorpciós spektruma a reakciócentrum jelenlétét mutatta. Így lehetséges volt a szén nanocsőhöz nem, vagy csak fizikailag kötődött RC eltávolítása a szuszpenzióból. Az üledéket felszuszpendáltam 500 μ L foszfát pufferben, majd rövid ideig ultrahangoztam. Ezután lefagyasztva, sötétben tároltam a mintát.

A második esetet tekintve a preparálás folyamata nagyon hasonlóan zajlott, annyi különbséggel, hogy a keresztkötőszereket a dializált reakciócentrum fehérjéhez adtam hozzá és ezt kötöttem az NH_2 -funkcionált MWCNT-höz (0,14 mg/mL). A protokoll lépései a továbbiakban megegyeztek.

Kémiai kötés nikkkel komplexen keresztül:

A reakciócentrum rögzítésének egy másik lehetséges módja a nikkkel komplexen keresztül történő immobilizálás. Ez megvalósulhat amino- és karboxil-funkcionált szén nanocsövek esetén is. Az egyik fontos különbség az előzőekben leírt módszerekhez képest, hogy ebben az esetben a donor oldalán polihisztidin-csoporttal jelölt 2.4.1. reakciócentrumot használtam. A szén nanocső funkciócs csoportjain keresztkötőszerek segítségével létrehozható nikkkel és nitrilotriecetsav komplexe ($\text{NTA}\cdot\text{Ni}^{2+}$), úgy hogy a Ni^{2+} -t először az NTA (N α ,N α -bis(karboximetil)-L-lizin) deprotonált karboxilcsoportjaihoz koordináljuk, majd az így kialakult komplexet rögzítjük a szén nanocső felületén. A fehérje immobilizálása során a nikkkel kelátképző tulajdonságának köszönhetően a reakciócentrum polihisztidin-csoportjának imidazol nitrogénjein keresztül jön létre a specifikus kötődés.

A szén nanocsövön lévő funkciócs csoporttól függően kétféle keresztkötőszert használtam. Karboxilcsoporttal funkcionált szén nanocső esetén a már korábban is említett karbodiimid és szukcinimid párosítást alkalmaztam a csoport aktiválására. Ezzel szemben az aminocsoporttal funkcionált szén nanocső esetében glutáraldehid (GTA) homobifunkcionális keresztkötőszert alkalmaztam aktiválóként, melynek segítségével a MWCNT spontán összekötődött az $\text{NTA}\cdot\text{Ni}^{2+}$ komplex aminocsoportjaival. A GTA két aldehidcsoporttal rendelkezik, amelyből az egyik a MWCNT szabad aminocsoportjához, míg a másik az NTA egy hozzáférhető lizin oldalláncához kötődik.

A protokoll első lépése ebben az esetben is a funkcionált MWCNT dializálása volt foszfát pufferben (0,1 M; pH 8,0; 0,006% LDAO). Ezt követte az ultrahangozás, majd a keresztkötőszerek hozzáadása (EDC/NHS: 100-100 μL ; 0,125 M; GTA: 100 μL ; 50%) és a szuszpenzió kevertetése. Az EDC/NHS esetén ez 2 órán keresztül, a GTA esetén 10 percig zajlott. Ezek után a mintákat újra dializáltam PBS-ben (0,1 M; pH 8,0; 0,006% LDAO) 4h-án át. Eközben 1 órán át kevertettem 200 μL NTA-t (5 mM) 200 μL NiCl_2 -dal (10 mM) foszfát pufferben

oldva (0,1 M; pH 8,0), majd hozzáadtam az aktivált szén nanocső szuszpenziókhöz és mágneses keverő segítségével kevertettem őket 2 órán át szobahőmérsékleten. A nem kötődött NTA·Ni²⁺ kimosása dializálással történt. Mindeközben a hisztidines reakciócentrum fehérjét (c ≈ 100 μM) is beletettem foszfát pufferbe (0,1 M; pH 8,0; 0,006% LDAO) dializálódni 2 órán át. Az idő letelte után hozzáadtam a RC-ot a szén nanocső szuszpenzióhoz és kevertettem a komplexet egy órán keresztül, majd a szokásos módon dializáltam. A nem kötődött reakciócentrumot ultracentrifugálással távolítottam el (15 perc, 130000 × g). A minta mosását addig folytattam, amíg a felülúszó abszorpcós spektruma a RC csúcsait mutatta.

Kémiai kötés ITO felületéhez:

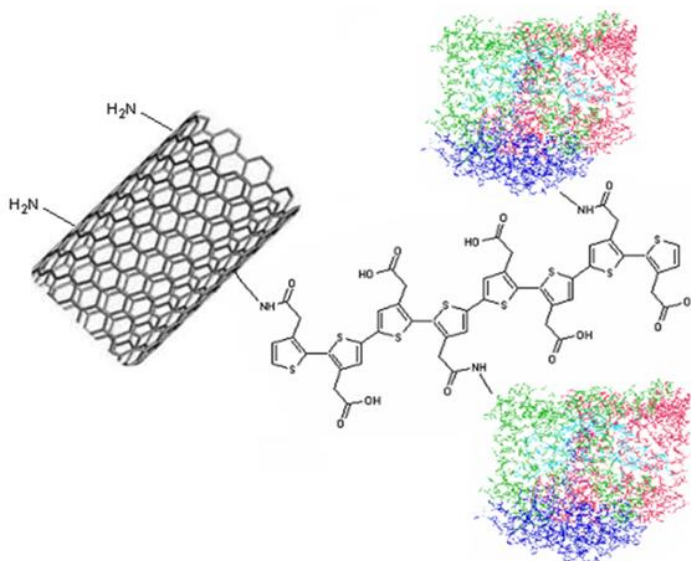
A korábban oldatokkal szerzett immobilizálási tapasztalatok alapján létrehoztam egy elektródot RC fehérjéből, szén nanocsövekből és ITO-ból (indium-ón-oxid). Az ITO (Praezisions Glas & Optik GmbH, Iserlohn, Németország) egy jó minőségű boroszilikát-üveglap, amelynek felületén indium-ón-oxid vékony vezető réteget hoztak létre. Amino- és karboxil-funkcionált többfalú szén nanocsövek alkalmazásával is készítettem mintát.

A minta rögzítéséhez mindkét esetben először az ITO felületének megtisztítására volt szükség, amelyet etanolos és acetonos mosással értünk el. Ezután funkciós csoportokat hoztunk létre a felületen, amelynek egyik lehetséges módja a szilanizálás. Kétféle szilánt használtunk attól függően, hogy milyen funkciós csoporttal rendelkező MWCNT-t kívántunk a felületen rögzíteni. Az amino-funkcionált szén nanocső esetében (3-Mercaptopropil)trimetoxiszilánt (10 μL/mL, toluolban) alkalmaztunk, melynek segítségével szabad SH-csoportokat hoztunk létre a felszínen. A preparálás ezen részét Szabó Tibor fizikus Ph.D. hallgató végezte. A létrehozott SH-csoportokhoz ezután szulfo-SMCC keresztkötőszerezrel rögzítettem az amino-funkcionált MWCNT-t. A fehérjét NHS és EDC kötőszerekkel aktiváltam és kötöttem a szén nanocsövekre. A preparálást követően az elektród felszínét intenzív mosásnak vettem alá desztillált vízzel és foszfát pufferrel (0,1 M; pH 7,0; 0,006% LDAO). A karboxil-funkcionált szén nanocső esetén (3-Aminopropil)trietoxiszilánt használtam, amely aminocsoportokat hoz létre a felszínen. A kialakított funkciós csoportokhoz EDC

és NHS segítségével rögzítettem a karboxil-funkcionált MWCNT-t, majd szintén ezen keresztkötőszerek segítségével rögzítettem a fehérjét a szén nanocsöveken.

Kémiai kötés vezető polimeren keresztül:

A polimeren keresztül történő kémiai kötés kialakításához PTAA (poli(3-tiofén ecetsav) vezető polimert és amino-funkcionált MWCNT-t alkalmaztam. A PTAA/MWCNT/RC komplex kialakításához először a PTAA oldathoz (1 mg/mL; 0,1 M-os foszfát pufferben; pH 8,0) hozzáadtam a MWCNT-t (0,14 mg/mL), majd a szuszpenziót 2 órán át szobahőmérsékleten kevertettem mágneses keverő segítségével. A kialakult komplexet ultracentrifuga segítségével távolítottam el a PTAA oldattól (20 perc, $130000 \times g$), majd a szeparált komplexet foszfát pufferrel (0,1 M; pH 8,0) mostam. Ezután hozzáadtam a RC-ot (65 μM) a tisztított komplexhez és 2 órán át kevertettem 4 °C-on, majd a keverékből a detergenst kidializáltam. Az így kialakított PTAA/MWCNT/RC komplexet ultracentrifuga segítségével (20 perc, $130000 \times g$) választottam el a RC oldattól (11.ábra).



11. ábra A PTAA-n keresztül kötött RC és amino-funkcionált MWCNT sematikus ábrája

A létrehozott komplex kötéséhez az ITO felületét először etanollal és acetonnal kellett mosni, amit az oxigén plazmás tisztítás követett. A tisztított hordozót először 5 percre foszfát pufferbe (0,1 M; pH 8,0), majd 10 percre PDPA (Poli(diallildimetilammónium klorid), 1,9 mM; pH 1,0 HCl) oldatba helyeztem. Az előkezelést követően az elektródot 15 percre a PTAA/MWCNT/RC oldatba merítettem, amely során létrejött az elektrosztatikai kötés.

4.2.2 Tormaperoxidáz enzim rögzítése szén nanocsövekhez

4.2.2.1 MWCNT/HRP komplex előállítása

A reakciócentrum fehérjénél is alkalmazott protokoll szerint (ld. 4.2.1.2 fejezet) történt a HRP rögzítése a karboxil-funkcionált MWCNT-höz. Az előzőleg tisztított és homogenizált szén nanocsőhöz hozzáadtam az NHS és az EDC keresztkötőszer oldatokat (100-100 μL ; 0,125 M) és 2 órán keresztül kevertettem a szuszpenziót 4 °C-on. Ezután 2 órán át dializáltam a mintát foszfát pufferben (0,1 M; pH 6,0; 0,006% LDAO), hogy a feleslegben jelenlevő keresztkötőszereket eltávolítsam. Eközben frissen elkészítettem a HRP oldatot (1 mg/mL), majd hozzáadtam az aktivált szén nanocső szuszpenzióhoz és egy éjszakán át kevertettem. Másnap ultracentrifugáltam a mintát (4 °C, 10 perc, 70000 \times g) és mostam foszfát pufferrel (0,1 M; pH 7,5), amíg a felülúszó fluoreszcenciája a peroxidáz enzim jelenlétét mutatta gvajakol és H_2O_2 hozzáadása után (ld. 4.3.4 fejezet). Az üledéket felszuszpendáltam 500 μL foszfát pufferben (0,1 M; pH 7,5), majd rövid ideig ultrahangoztam. Ezután lefagyasztva tároltam a mintát. A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten végeztem.

Kísérletet tettem a HRP amino-funkcionált szén nanocsőhöz történő immobilizálására is GTA alkalmazásával. A preparálás lépési megegyeztek az előzőekben leírttal az alkalmazott keresztkötőszer kivételével. A funkciós csoport aktiválásakor 100 μl 50%-os GTA-t használtam 10 percig, majd kidializáltam a szén nanocső szuszpenzióból. A HRP rögzítése a szokásos módon zajlott.

4.2.2.2 A MWCNT/HRP komplex-szel borított ITO elektród elkészítése

Az ITO felületét először etanolos és acetonos mosással tisztítottuk, majd szilanizáltuk ((3-Aminopropil)triethoxiszilán), így hozva létre $-\text{NH}_2$ funkciós csoportokat a felületén. Ezek után a karboxil-funkcionált többfalú szén nanocsövet (0,14 mg/mL) az NHS és EDC keresztkötőszerek hozzáadásával aktiváltam és kötöttem az ITO felületéhez. Ezt követően az elektród felszínét intenzív mosásnak vettem alá desztillált vízzel és foszfát pufferrel (0,1 M;

pH 7,0). Az elektród felületére rögzített szén nanocsöveket ismét aktiváltam keresztkötőszerek (EDC, NHS) alkalmazásával. A tormaperoxidázt erre a felületre cseppentettem, majd 2 óra inkubációs idő után az elektród felületét többször mostam desztillált vízzel és foszfát pufferrel (0,1 M; pH 7,0).

4.3 Vizsgálati módszerek

4.3.1 Egyensúlyi abszorpciómérés

A RC oldat abszorpciós spektrumát UNICAM UV4 típusú kétsugaras spektrofotométerrel vettem fel. A fényszórásból adódó mérési hibák kiküszöbölésére a spektrofotométer közeli mintahelyzetét használtam a mérések során. Mint azt már korábban említettem (ld. 2.3.1.1 fejezet), a reakciócentrum fehérje jellemző abszorpciós sávjai egymástól viszonylag távoli hullámhossz tartományokban vannak, így a spektrumot az UV tartománytól egészen a közeli infravörös tartományig (250 nm – 900 nm) fel kellett vennem. A mérésekhez kvarcküvetát használtam.

A RC tisztasága meghatározható az OD_{280nm}/OD_{800nm} arányból (ld. 2.3.1.1 fejezet), koncentrációja pedig a Beer-Lambert törvény alkalmazásával az $\varepsilon_{800} = 288 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ extinkciós koefficiens segítségével (Straley és mtsai., 1973).

$$\Delta A(\lambda) = \Delta \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l,$$

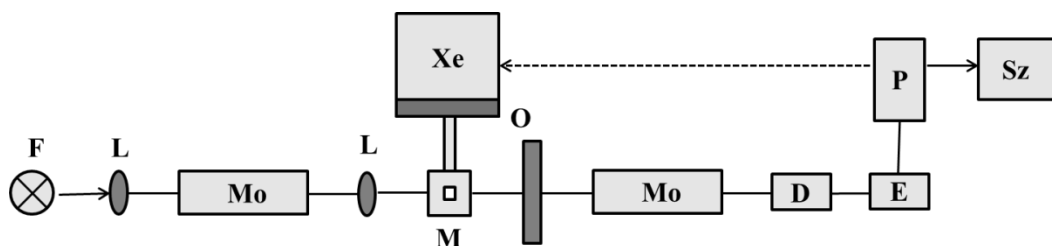
ahol $\Delta A(\lambda)$ a moláris abszorbancia adott hullámhosszon, c a koncentráció, l pedig a fény útja a küvetában.

4.3.2 Az abszorpcióváltozás mérése

A reakciócentrumban fényimpulzus hatására bekövetkező abszorpcióváltozást egy házilag készített egysugaras spektrofotométerrel vizsgáltam (12. ábra; Tandori és mtsai., 1995). Egy stabilizált áramforrásból táplált 50 W-os és 12 V-os halogén autóizzó szolgáltatja a mérőfényt, amelyet egy monokromátor (Jobin Yvon) belépő részére fókuszáltam kondenzor lencse alkalmazásával. A kilépő fényt a mintát tartalmazó küvetán keresztül a fotoelektron-sokszorozó (Hamamatsu R928) fotokatódjára képeztem le. Egy Xe-villanólámpa (EG&G FX200, $t_{1/2} \approx 8,5 \text{ } \mu\text{s}$) biztosította az optikai gerjesztést, a telítési gerjesztést pedig plexi fényvezető segítségével értem el. Keresztezett

optikai szűrőket alkalmaztam a fotoelektron-sokszorozó védelmében. Az így megmaradó vörös sáv elegendő a telítési gerjesztéshez.

A mérőfény intenzitásának nagysága lehetővé teszi az abszorpcióváltozás mérését kis zaj esetén. A fényfelvillanás előtti stacionárius állapot kiegyenlítésére 100 mV kiegyenlítő (offset) feszültséget kapcsoltam a fotokatódra, amit a mérőfény hatására a munkaellenálláson (10-100 k Ω) fellépő feszültséggel kiegyenlítettem a flash előtt. Az analóg erősítő jelét 3206B típusú PicoScope-pal digitalizáltam, amelyet USB csatlakozón keresztül laptop számítógéppel vezéreltem.



12. ábra A fényindukált abszorpcióváltozást mérő készülék blokkdiagrammja. F: halogén autoizzó (50 W, 12 V), L: lencse, Mo: monokromátor, M: minta, Xe: xenon villanólámpa, O: optikai szűrő, D: detektor, E: erősítő, P: pikoszóóp, Sz: laptop számítógép

A fénygerjesztés hatására bekövetkező töltésstabilizálódást a $P^+Q^- \rightarrow PQ$ töltésrekombináció nyomon követésével vizsgáltam 430 nm-nél, ahol az impulzusgerjesztés hatására keletkező P^+ visszaredukálódását mértem.

A peroxidáz enzimnél bekövetkező abszorpcióváltozást szintén az egysugaras spektrofotométerrel vizsgáltam, azonban itt nem volt szükség fénnnyel történő gerjesztésre. Itt a reakciót a H_2O_2 mintához adása indította el. A készülék jó jel/zaj viszonyal tette lehetővé a 10^{-4} - 10^{-5} OD változás mérését is egysugaras módon.

Az abszorpció méréséhez a monokromátor hullámhosszát gvajakol esetén 470 nm-re, amplex red (AR) esetén pedig 570 nm-re állítottam. Ezek után hozzáadtam a hidrogén-peroxidot és a gvajakolt/amplex redet a mintához, aminek hatására beindult az enzimreakció. A mérés során a színes termék felhalmozódását követtem, amelyből a később leírtak alapján meghatároztam a H_2O_2 fogyás sebességét, valamint az enzimaktivitást a tetragvajakol (gvajakol) és rezorufin

(AR) extinkciós koefficiensét felhasználva (reakció kinetikát lásd később 4.3.4 fejezet).

4.3.3 Az adatok kiértékelése

Az abszorpcióváltozás során bekövetkező töltésrekombináció vizsgálatát az elsőrendű kinetikai egyenlet segítségével végeztem.

$$A(t) = A_i \exp(-k_i t)$$

ahol $i = AP$ megfelel a $P^+Q_A^-Q_B \rightarrow PQ_AQ_B$ (k_{AP}) vagy a $P^+Q_AQ_B^- \rightarrow PQ_AQ_B$ (k_{BP}) töltésrekombinációnak.

Az egyenletet 2 komponensre alkalmaztam,

$$A(t) = A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t) + A_0,$$

formában, ahol A az amplitúdó, k a sebességi állandó, t az idő, A_0 pedig egy, a mérés bizonytalanságaiból (mérőfény ingadozása) adódó konstans. Az időállandónál az első néhány tíz-száz μ s-os komponens $P^+Q_A^-Q_B \rightarrow P^+Q_AQ_B^-$, azaz az AB előre menő transzferre, míg a második 100 ms – 1 s-os komponens a töltésrekombinációra fordítódik (Dorogi és mtsai., 2006). Az A_0 esetén azokat a mérési eredményeket használtam fel, ahol ennek értéke nem haladta meg a teljes amplitúdó 10%-át.

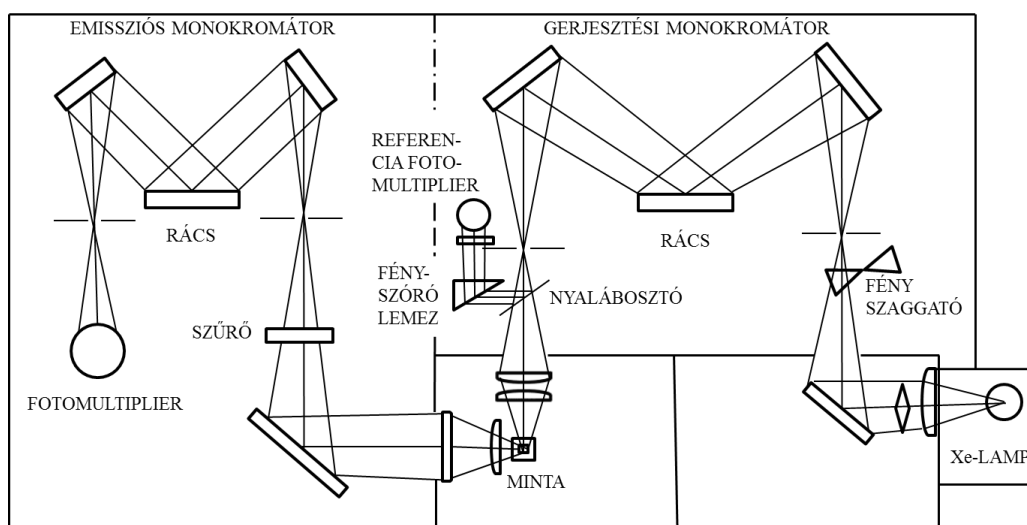
Az adatok kiértékelését (multiexponenciális illesztéseket) OriginPro 8.5 (OriginLab) programmal végeztem.

4.3.4 Fluoreszcencia mérések

A méréseimhez Perkin Elmer spektrofluorimétert (MPF44A) használtam. A készülékben két monokromátor található, az egyik a gerjesztő, a másik pedig a megfigyelő oldalon. A berendezés a Xe-lámpa által szolgáltatott gerjesztő fényt egy monokromátor segítségével felbontja hullámhossz szerinti komponensekre és a megfelelő hullámhosszú fényt engedi rá a mintára. Egy másik monokromátor segítségével a minta által emittált fluoreszcens fényt bontja hullámhossz szerinti komponensekre, amelyet egy fotoelektron-sokszorozó érzékel. A detektált

elektromos jel megmutatja az intenzitást, amelynek felvételét egy számítógéphez USB porton csatlakoztatható PC oszcilloszkóppal végeztem (PicoScope 3206B, 13. ábra). Így meg lehet határozni mind a gerjesztési, mind az emissziós színeképet, valamint fel lehet venni a gerjesztési-emissziós színeképet.

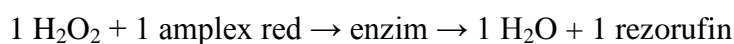
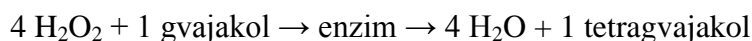
A fény érzékelésére alapozódó technika detektorai ma már igen érzékenyek lehetnek, ezért különösen oda kell figyelni, hogy a zavaró fények (minta vagy a berendezés elemeinek fényszórása, stb.) minél kisebb mértékben jussanak a detektorba.



13. ábra A Perkin Elmer spektrofluoriméter felépítése és sugármenete

A tormaperoxidáz enzim aktivitásának meghatározásához a hidrogén-peroxid bomlási folyamatát használtam fel. A folyamat követésére kettő olyan könnyen oxidálható anyagot választottam (gvajakol, amplex red), amelyek oxidációja színes terméket eredményez (tetragvajakol, rezorufin), így ezek felhalmozódását abszorpciós és/vagy emissziós (fluoreszcencia) spektroszkópiával követni tudtam és a reakció sztöchiometriája alapján meghatároztam a H_2O_2 mennyiségét.

Méréseim során a H_2O_2 -ot szubsztrátként, a gvajakolt/amplex redet pedig hidrogén donorként alkalmaztam. Hogy az enzimreakció sebességét az enzimkoncentráció határozza meg, a rendszerhez feleslegben kellett hozzáadni az oxidálandó anyagot és a H_2O_2 -t. Az enzimreakciók a következők szerint zajlanak:



A gvajakol esetén a gerjesztési hullámhosszat 300 nm-re, az emissziós hullámhosszat pedig 355 nm-re állítottam be a fluoriméteren. Az amplex red esetében ezen értékek 545 nm és 585 nm voltak.

A fluoreszcencia mérés sokkal érzékenyebb módszer az abszorpciómérésnél. Másrésről azonban az általam használt komplexek szén nanocső tartalmuk miatt jelentős fényszóró tulajdonsággal bírnak, amely megnehezíti az analízist.

4.3.5 Az enzimaktivitás meghatározása

A HRP enzimaktivitását az abszorpciós kinetikából és a fluoreszcenciából határoztam meg. Az abszorpcióváltozás mérése lehetőséget ad a gvajakol és az amplex red koncentrációjának megállapítására, így a hidrogén-peroxid koncentrációváltozása meghatározható abszolút értékben, mivel a tetragvajakol és a rezorufin moláris extinkciósoefficiensei ismertek ($\epsilon(\lambda)_{\text{tetragvajakol}} = 26600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Maehly & Chance, 1954), $\epsilon(\lambda)_{\text{rezorufin}} = 58000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Vergauwen és mtsai., 2003)). Az abszorpció változása a következő összefüggés szerint számolható ki:

$$\Delta E(t) = \log \frac{I_0}{I_0 - 0,01 \cdot \Delta I(t)}$$

ahol I_0 a mérőfény intenzitásával arányos offset feszültség (100 mV), $\Delta I(t)$ a kiváltott feszültségváltozás az idő függvényében. A mérések során 100-szoros erősítést alkalmaztam, ezt jelzi a 0,01 szorzó az egyenletben. Az $E(t)$ ismeretében a Beer-Lambert törvényből kiszámíthatjuk az elredukált hidrogén-peroxid mennyiségét:

$$[H_2O_2](t) = \frac{E(t)}{4 \cdot \epsilon(\lambda) \cdot l}$$

ahol l a küvetta hossz (1 cm), a 4-es szorzóval pedig azt vettem figyelembe, hogy minden tetragvajakol molekula keletkezésekor 4 db hidrogén-peroxid redukálódik el. A rezorufin keletkezésekor a sztöchiometriai arány 1:1. A bemért enzim és az

elredukálódott H_2O_2 mennyiségének ismeretében megkapjuk az enzimaktivitást $M_{(\text{hidrogén-peroxid})}/(M_{(\text{enzim})} \cdot s)$ mértékegységben.

A reakciósebesség közvetlen meghatározásához az enzimreakció koncentrációfüggésének megfelelő kalibrációjára van szükség a fényszórás és a fluoriméter eltérő beállításai (gerjesztési és emissziós rések, erősítés, geometria) miatt. Ezt azután össze kell vetni az abszorpcióváltozás hasonló kalibrációjával.

A tetragvajakol és rezorufin kialakulásának sebessége (amely arányos a H_2O_2 fogyással) meghatározható a fluoreszcencia intenzitásának változásából:

$$I_f(t) = K \cdot I_0 \cdot c(t) \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot l \cdot Q$$

Itt I_0 a beeső fény intenzitása, $\Delta I(t)$ a fényintenzitás változása az idő függvényében, $I_f(t)$ a fluoreszcencia intenzitása az idő függvényében, $c(t)$ a koncentráció változása az idő függvényében, $\varepsilon(\lambda)$ a moláris extinkciós koefficiens, l az optikailag megtett út, Q a fluoreszcencia kvantumhatásfoka és K a műszerre jellemző állandó (Magyar és mtsai., 2013).

4.3.6 Ciklikus voltammetria

Az enzimelektród elektrokémiai aktivitásának ellenőrzésére a ciklikus voltammetria módszerét használtam. A mérés lényege, hogy a potenciált megfelelő polarizációs sebességgel lineárisan változtatva (esetemben 50 mV s^{-1}) az áramjelet mérjük (Yoon-Mee és mtsai., 2006). A potenciálhatárokat (kezdő- és végpotenciál) a mérendő rendszer tulajdonságainak ismeretében választjuk meg. Amikor egy bizonyos potenciálhoz érünk (végpotenciál), a polarizáció irányát megváltoztatva ismét a kezdőpotenciál felé haladunk.

Ha a cellában alkalmazott elektrolitoldat – esetemben 50 mL kálium-foszfát puffer ($0,1 \text{ M}$; $\text{pH } 7,0$) és 20 mM KCl – elektrokémiaileg aktív (oxidálható vagy redukálható) komponenst tartalmaz, akkor a potenciált változtatva töltésátlépés játszódhat le. A mérés során felvehető áram-potenciál görbéken megjelenő két csúcsot katódos, illetve anódos csúcsnak nevezik. A katódos csúcsnál végbemenő reakció a redukció (negatív áram), az anódos csúcsnál pedig az oxidáció zajlik (pozitív áram).

A méréseket a mintát sötétben, szobahőmérsékleten tartva végeztem PGSTAT10 potenciosztát/galvanosztát használatával. A munkaelektrod az általam készített ITO/MWCNT/HRP enzimelektrod, az ellen-, és referencia-elektrodok platina és Ag/AgCl voltak.

4.3.7 Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

A TEM esetében a vizsgált mintát átvilágítják a berendezés sugárforrásából (elektronágyú) érkező elektronsugárral. A létrejött elektronoptikai kép az elektronoknak a szilárd test atommagjain, illetve elektronjain való rugalmas szóródásának és elhajlásának köszönhető. A TEM felvételek egy Philips CM 10 típusú 100 keV energiájú elektronokkal működő berendezéssel készültek az SZTE ÁOK Patológiai Intézetében.

4.3.8 Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

A SEM esetében a minta felületét egy jól fókuszált elektronnyalábbal soronként letapogatják (végigpásztázzák), a mintáról visszaérkező elektronokkal pedig egy katódsugárcső fényintenzitását vezérlik. A felvételek Hitachi S-4700 típusú II FE-SEM műszerrel készültek, 3 kV gyorsító feszültséggel. A mintákat a mérés előtt szénszalaggal rögzítettem a mintatartóra. Az ITO minták esetén szükség volt azok leföldelésére erős vezető tulajdonságuk miatt. A mérések az SZTE TTIK elektronmikroszkóp laboratóriumában történtek.

4.3.9 Atomerő mikroszkópos vizsgálatok (AFM)

Az AFM képek száraz körülmények között készültek, egy Molecular Force Probe 3D vezérlőszerkezettel (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) ellátott Asylum MFP-3D fej segítségével. A felvételek tapogatómódban készültek, derékszögű szilícium tartókaros, kb. 7 nm sugarú hegygel (Olympus Microcantilever, OMCL-AC240TS). A mintákat a vizsgálatokhoz én készítettem elő, de a méréseket dr. Németh Zoltán végezte Gergely Csilla (Université Montpellier, Franciaország) laboratóriumában.

5. Eredmények és kiértékelésük

5.1 CNT/RC kompozitok jellemzése

Kiváló fizikai paramétereiknek köszönhetően a szén nanocsövek szervesetlen részecskékként és biomolekulákkal összekapcsolva alkalmasak kompozit anyagok létrehozására is. A fehérje komplexek beépítéséhez olyan hordozóként szolgálnak, amelyek tartós és erős elektromos kapcsolat kialakítására képesek ezekkel, valamint más hasznos tulajdonságokkal is rendelkeznek. A nagymértékben rendezett szén nanocsövek alkalmazhatók immobilizációs mátrixként, vagy mediátorként is harmadik generációs amperometriás bioszenzorok kifejlesztéséhez (Sotiropoulou & Chaniotakis, 2003).

Az SWCNT-k fotoszintetikus fehérjékkel alkotott komplexei képesek a töltésátviteli állapotok stabilizálására is (Dorogi és mtsai., 2006), ugyanis a szén nanocsövek kapcsolódása növeli a $P^+Q_B^-$ állapot élettartamát, minden valószínűség szerint a pozitív (az oxidált primer elektron donor, P^+) és a negatív (szemikinon formák, Q_A^- és Q_B^- , a redukált primer és szekunder kinon) töltések felhalmozódásának köszönhetően. Munkám során először fizikai szorpcióval rögzítettem a fehérjéket az egyfalú szén nanocsövekhez, majd ezen minták stabilitását vizsgáltam a hőmérséklet, az inkubációs idő és a minta előállítása során alkalmazott kémhatás szempontjából.

Mivel a fizikai szorpció a fehérje nem specifikus kötését eredményezi, következő lépésként keresztkötőszerek segítségével rögzítettem a fotoszintetikus reakciócentrumot kémiai úton többfalú funkcionált (amino- vagy karboxilcsoporttal) szén nanocsövekhez. Ennek során az irodalomban alapjaiban már ismert eljárási módszereket ültettem át a mi laboratóriumi körülményeink közé és vizsgáltam a létrehozott komplexek fényindukált abszorpcióváltozását.

A különböző módszerrel létrehozott bionanokompozitok aktivitásának összehasonlítását követően feladatomban volt a legalkalmasabb eljárás felhasználásával egy fotokémiai aktivitást mutató elektród létrehozása RC-ből, szén nanocsőből és ITO-ból, és ezen elektród preparálási körülményeinek optimalizálása.

5.1.1 Fizikai szorpció

A fotoszintetikus reakciócentrumot üveglapra szárítva, akár detergenst is tartalmazó filmmel együtt is (Clayton, 1978), a fehérje fotokémiai aktivitása mérhető, amit a fényindukált abszorpcióváltozás is jól bizonyít. Detergens szuszpenzióban a 430 nm-en, vagy 860 nm-en mért egyetlen telítési fényimpulzust követő abszorpcióváltozás jellegzetes, kétfázisú kinetikát mutat. Ez elmondható az egyfalú szén nanocsőhöz elektrosztatikusan, fizikai szorpcióval rögzített RC esetén is (Dorogi és mtsai., 2006).

Az abszorpcióváltozás lecsengésének gyors komponensét az elsődleges ($P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$), míg a lassút a másodlagos kinonról történő rekombináció ($P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$) adja. Méréseim során a fotokémiai aktivitást a másodlagos kinon (Q_B) aktivitásaként definiáltam és a $P^+Q^- \rightarrow PQ$ töltésrekombináció lassú komponensének részarányával, időállandójával és teljes amplitúdójával értékeltem.

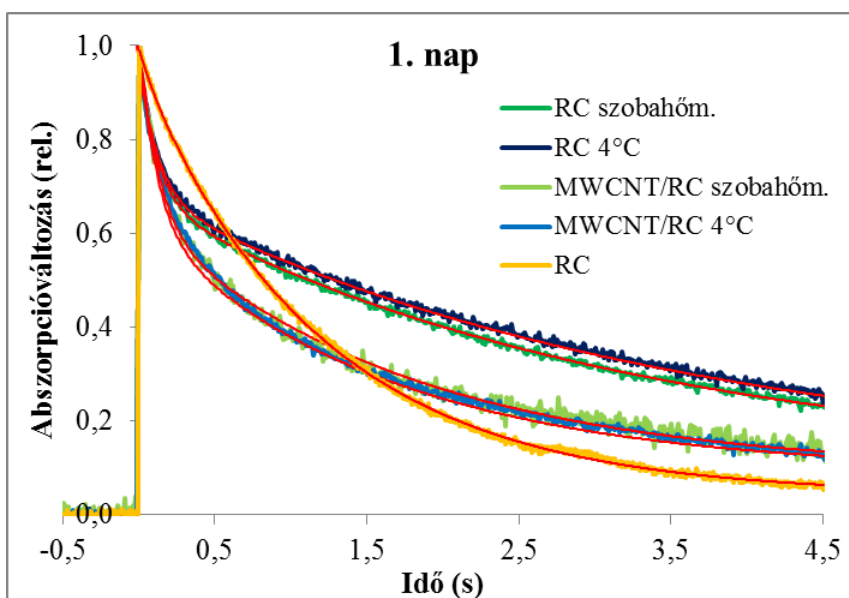
Munkám során, első lépésként, célul tűztem ki a reakciócentrum fehérje funkcionálatlan egyfalú szén nanocsőhöz való rögzítését fizikai szorpció segítségével. Meghatároztam azt, hogy hogyan befolyásolja a kémhatás (pH) a RC/SWCNT kompozit létrejöttét és hogyan változik fotokémiai aktivitása az inkubálási idő függvényében szobahőmérsékleten és 4 °C-on.

5.1.1.1 A hőmérséklet hatása a nanokompozit stabilitására

A fotoszintetikus reakciócentrum fehérje egy olyan fehérje komplex, amely aktivitását sokáig megőrzi, abszorpciós kinetikája azonban a minta életidejével és a környezeti faktoroktól függően változik. Ezen változások megfigyelhetőek a teljes amplitúdó csökkenésének és a gyors és lassú komponensek részarányának, illetve életidejének a követésével. A RC stabilitásának vizsgálatára ezért négy féle mintát készítettem. Kettő esetben a fehérjét hozzákötöttem egyfalú szén nanocsőhöz (detergens mentes), a másik két esetben az eredeti R-26 RC törzsoldat szuszpenziót használtam (detergenst tartalmazó), majd felcseppentettem őket diaüveglapra és N_2 áram alatt szárítottam őket. Ezután egy RC és egy kompozit mintát 4 °C-on, a másik kettőt pedig szobahőmérsékleten (25 +/-5 °C) tároltam és

abszorpciós kinetikájukat az eltelt idő függvényében vizsgáltam két és fél hónapon keresztül.

A RC törzsoldat szuszpenzió detergens jelenlétében referenciaként és a száraz minták első napon mért tulajdonságai láthatóak a 14. ábrán, amelyek jól mutatják a reakciócentrumra jellemző karakterisztikus kétfázisú kinetikát (ld. 4.3.3 fejezet). A jobb összehasonlíthatóság kedvéért a görbék teljes amplitúdóját 1-re normáltam, mivel a minták heterogenitása miatt az üveglapra való cseppentés során nem azonos mennyiségű RC került a felületre, illetve a minták ki- és behelyezése következtében a mérőfény kissé más-más helyeken gerjesztette a mintákat. A minták megfelelő előkészítésével azonban elérhető volt az, hogy ezek a mérési körülmények a teljes amplitúdóban csak kismértékű variabilitást eredményezzenek.



14. ábra A RC oldatbeli (detergens jelenlétében) és a RC fehérjét tartalmazó üveglapra szárított minták (ld. jelölések az ábrán) első napon mért abszorpcióváltozása egyetlen telítési, rövid idejű fényimpulzussal történő gerjesztés után, 430 nm-en. A piros vonalak az exponenciális illesztés során kapott számolt görbéket jelölik.

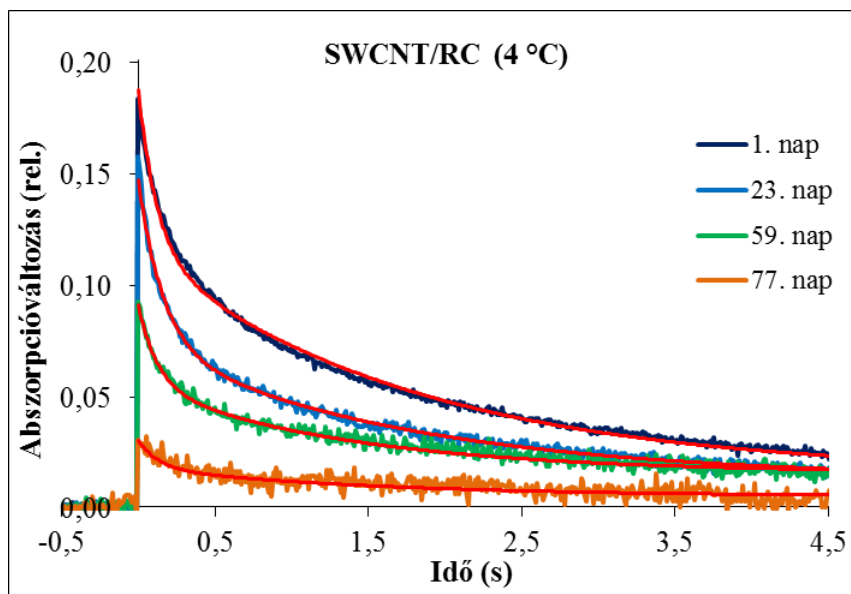
A multiexponenciális görbeillesztésekből számolt értékeket (a preexponenciális amplitúdóértékeket és a lecsengések élettartamait) az 1. táblázatban mutatom be. A gyors komponens időállandóját a kiértékelés során minden esetben az irodalomban általánosan elfogadott 120 ms-os élettartammal rögzítettem. Ezzel a mért abszorpcióváltozások jól modellezhetőek voltak.

A lassú komponens részaránya a szén nanocső nélküli mintákban nagyobbak mutatkozik az első napon, élettartama pedig 3000 ms feletti, amely a RC oldatban mérhető 1200 ms-os élettartamához képest igen nagy eltérést mutat. Ennek oka a mintában jelenlévő relatív detergens tartalom lehet, amely a szén nanocső nélküli minták esetén nem lett kidializálva. A szén nanocsövet tartalmazó komplexek élettartama ugyan kisebb mértékű növekedést mutat, de ezen mintáknál a detergens jelenléte nem szolgálhat magyarázatként. Ugyanakkor a komplexek általánosan mért tulajdonságai egyezést mutatnak a korábban Dorogi és mtsai. (2006) által tett megfigyelésekkel, miszerint a lassú komponens élettartama szén nanocsövet tartalmazó komplexek esetén meghaladja az irodalomban elfogadott 1200 ms-ot. A $P^+Q_B^-$ állapot élettartamának növekedését minden valószínűség szerint a pozitív és a negatív töltések felhalmozódása okozza, a nanocsőhöz való kapcsolódás eredményeként.

Minta	$A_{\max}(V)$	$A_{\text{lassú}}(\%)$	$\tau_{\text{lassú}}(Q_B)$ (ms)
RC szobahőm.	0,20	60,1	3 160
RC 4 °C	0,16	60,5	3 477
SWCNT/RC szobahőm.	0,07	51,8	1 630
SWCNT/RC 4 °C	0,19	53,7	1 774
RC oldat	0,34	91,7	1 199

1. táblázat A multiexponenciális görbeillesztésből származó adatok a minták egyszeri fényimpulzussal való gerjesztése után az 1. napon. A_{\max} : a $t=0$ s időpontban mért abszorpcióváltozás teljes amplitúdója, $A_{\text{lassú}}(\%)$: a lassú komponens részaránya, $\tau_{\text{lassú}}(Q_B)$ a lassú komponens időállandója.

A 15. ábrán a 4 °C-on tárolt egyfalú szén nanocső/reakciócentrum komplex abszorpciós kinetikái láthatóak az eltelt napok függvényében. A folytonos piros vonalak a multiexponenciális görbeillesztések eredményeit mutatják, így együtt láthatjuk a mért és a számított görbéket. A könnyebb követhetőség érdekében csak a tendenciát jellemzően mutató görbéket tüntettem fel.



15. ábra A 4 °C-on tárolt SWCNT/RC komplex abszorpcióváltozása az idő függvényében egyetlen telítési fényimpulzussal történő gerjesztés után. A folytonos piros vonalak a multiexponenciális görbeillesztés eredményeit mutatják.

A számolt görbékhez tartozó paramétereket a 2. táblázatban rendeztem. A teljes amplitúdó a kezdetekben lassú csökkenést, a 2. hónap végére azonban kb. 50%-os esést mutatott, majd 2 és fél hónap után kb. 20%-ra csökkent. Mindeközben a lassú komponens részaránya a teljes lecsengés 50%-át tette ki és nem változott jelentősen az inkubációs idő végéig. A lassú komponens időállandója kb. 1800 ms volt az első napon, amely 2 és fél hónap elteltével kb. 1500 ms-ra csökkent, de még így is magasabb értéket mutatott, mint az oldatbeli RC. A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten végeztem.

Napok száma	A_{\max} (V)	$A_{\text{lassú}}$ (%)	$\tau_{\text{lassú}} (Q_B)$ (ms)
1	0,187	53,7	1 775
23	0,154	42,2	1 514
59	0,092	43,5	1 521
77	0,031	46,2	1 470

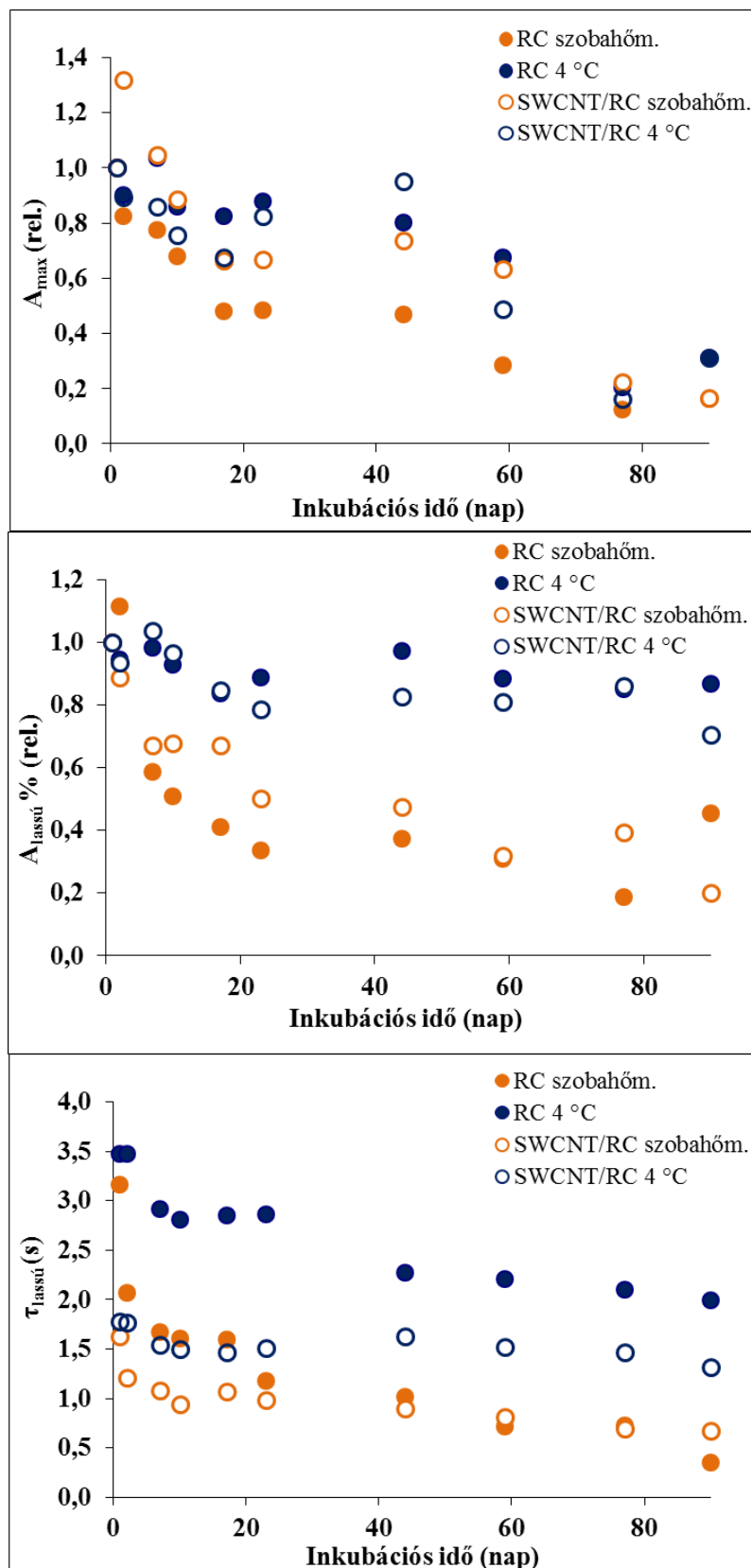
2. táblázat A SWCNT/RC komplex egyszeri fényimpulzussal való gerjesztése utáni teljes amplitúdója, lassú komponensének időállandója és %-os változása az inkubálási idő függvényében. A_{\max} : a $t=0$ s időpontban mért abszorpcióváltozás teljes amplitúdója, $A_{\text{lassú}}$ (%): a lassú komponens részaránya, $\tau_{\text{lassú}} (Q_B)$: a lassú komponens időállandója.

A 16. ábrán a 4 féle mintához tartozó teljes amplitúdót és a lassú komponensek részarányát 1-re normálva, illetve a könnyebb áttekinthetőség érdekében a lassú komponensek élettartamának mért értékeit mutatom be az inkubálási idő függvényében (Magyar és mstai., 2011).

A szobahőmérsékleten tárolt RC mintánál a teljes amplitúdó már 2 hét elteltével lecsökkent a felére, amit egy lassabb esés követett, mígnem elérte a 10%-ot, ami alatt a további fittelési eredmények megbízhatatlannak számítanak. Lassú komponensének részaránya egy kezdeti ugrást követően egy hét után 60%-ra, majd az inkubációs idő végére 20%-ra csökkent. A lassú komponens időállandója az első napon kb. 3200 ms volt, amely már a második napra elérte a 2000 ms-ot, majd fokozatosan gyorsulva 2 és fél hónap elteltével kb. 720 ms-ra csökkent.

A 4 °C-on tárolt RC esetén a teljes amplitúdó 2 hónapig alig mutatott változást, majd hirtelen csökkenést követően elérte a 20%-ot. Lassú komponensének részaránya a teljes lecsengés 60%-át adta az első napon és mindössze kb. 10%-ot csökkent az inkubációs idő végéig. A lassú komponens időállandója kb. 3500 ms volt kezdetekben, majd egyenletes csökkenést követően 2 és fél hónap után is kb. 2000 ms-os életidővel rendelkezett.

A szobahőmérsékleten tárolt SWCNT/RC komplex teljes amplitúdója az azonos körülmények között tárolt reakciócentruméhoz képest még 2 hónap után is csak 70%-ra csökkent. Lassú komponensének részaránya a teljes lecsengés 50%-át tette ki a kezdeti méréseknél, majd egyenletes csökkenést követően a 77. napra ez már csak 20%-át tette ki. A lassú komponens kb. 1600 ms-os élettartammal rendelkezett a kezdetekben, ami a mérések végére kb. 700 ms-ra csökkent.



16. ábra A minták fotokémiai aktivitása különböző hőmérsékleteken az inkubálási idő függvényében (ld. jelölések az ábrán). Az ábrán az abszorpcióváltozás teljes amplitúdóját (felső ábra), a lassú fázis relatív amplitúdóját (középső ábra) és élettartamát (alsó ábra) mutatom be.

A szobahőmérsékletű RC teljes amplitúdója közel 70%-os csökkenést mutatott 2 hónap után, míg a 4 °C-on tartott reakciócentrumnál ez a csökkenés egyenletesebben zajlott le és 2 hónap elteltével is csak kb. 30%-os volt. Mindkét szén nanocsövet tartalmazó minta esetén elmondható, hogy teljes amplitúdójuk ugyanezen idő alatt kb. 50%-kal csökkent.

A lassú komponens részarányát tekintve elmondható, hogy a hőmérséklet hatással van rá, hiszen a szobahőmérsékleten tárolt minták esetén karakterisztikus csökkenés figyelhető meg, azonban míg ez a csökkenés a RC esetén közel 80%-os, a SWCNT-et tartalmazó minta esetén csak 60%-os volt két és fél hónap után. A 4 °C-on tárolt minták lassú komponensének részaránya szinte nem, vagy csak alig változott az eltelt napok függvényében.

A szobahőmérsékleten tárolt üveglapra szárított RC abszorpcióváltozásában a lassú komponens időállandójának csökkenése sokkal nagyobb léptékű volt, mint amit a 4 °C-osnál számoltam. A párhuzamos, szén nanocsövet is tartalmazó minták esetén az időállandók minden esetben kisebbek voltak, mint az azonos hőmérsékleten tárolt szén nanocsövet nem tartalmazó minták esetén, azonban sokkal egyenletesebben tartották értékeiket.

Összehasonlítva a fizikailag kötött RC lassú komponensének részarányát és időállandóját az LDAO detergenst tartalmazó szárított RC-nál mérttel elmondható, hogy a lassú komponens időállandója a leszártítás után a szén nanocsőhöz kötött RC esetében sokkal stabilabb, a hőmérséklet pedig részarányának alakulását befolyásolja. Ugyanakkor a minták még 3 hónap után is aktívak maradtak.

5.1.1.2 Az előállítás során alkalmazott pH hatása a nanokompozit stabilitására

A kompozitok stabilitása szempontjából fontos meghatározni a preparálás folyamán alkalmazott optimális körülményeket, hiszen bármely környezeti faktor képes befolyásolni a RC élettartamát a komplexekben. Ha stabil biokompozitot szeretnénk létrehozni, fontos a reakciócentrumot károsító folyamatokat megismerni és a lehetőségekhez mérten minimalizálni. Egy ilyen környezeti faktor lehet a minta készítése során alkalmazott pH hatása. Ennek vizsgálatára a

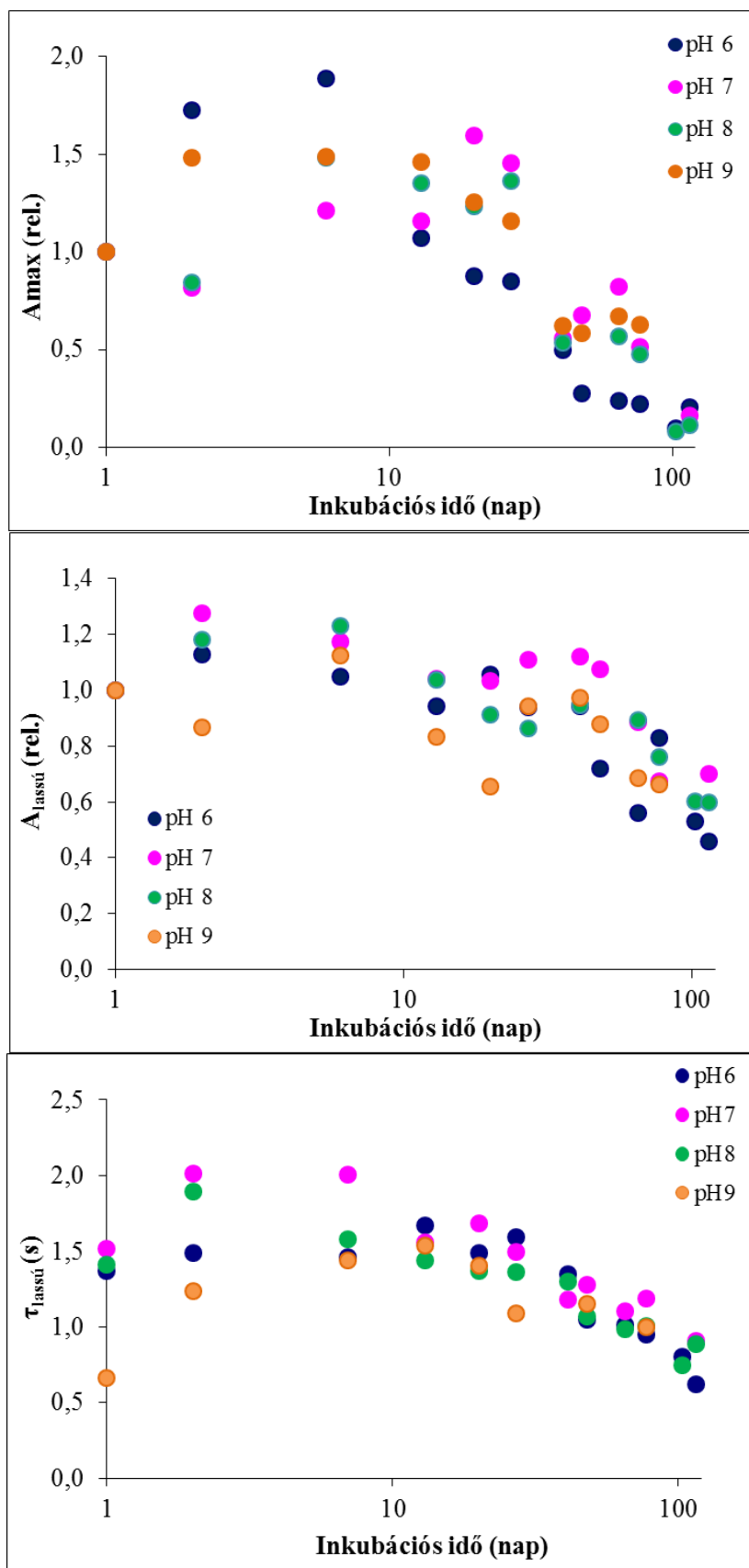
fizikai kötés során különböző pH-jú (6,0; 7,0; 8,0; 9,0) foszfát puffer oldatokat (0,1 M) készítettem és ezekben dializáltam a SWCNT/RC kompozitokat 4 °C-on, 2 napig. Ezalatt a mintákból távozott a detergens, valamint azok pH-ja is az alkalmazott puffer pH-ját vette fel. Ezután a mintákból felcseppentettem diaüveglapra és N₂ áram alatt szárítottam, majd 4 °C-on tároltam őket és 4 hónapon keresztül mértem a fényindukált abszorpcióváltozásukat. A már előzőekben alkalmazott multiexponenciális görbeillesztés segítségével értékeltem a mért jeleket.

A 17. ábrán a különböző pH-n elkészített minták teljes amplitúdója és a lassú komponensek részaránya 1-re normálva, a lassú komponens élettartama pedig az eredeti értékeivel látható az inkubálási idő függvényében. A mintavétel sűrűsége és a könnyebb áttekinthetőség érdekében az adatokat logaritmikus skálán ábrázoltam.

A pH 6,0-án készített SWCNT/RC mintánál a teljes amplitúdó első héten bekövetkező jelentős növekedését követően már másfél hónap után lecsökkent 30%-ra, majd egyenletesen csökkenve elérte a 20%-ot a negyedik hónap végére. Lassú komponensének részarányát jól tartotta, két hónap után mindössze 40%-os esés mutatkozott, majd a 4. hónap végére egyenletesen lecsökkent további 15%-ot, míg időállandója az első napon kb. 1400 ms volt, amit 40 napig megtartott, majd a mérések végére elérte a 620 ms-ot.

A pH 7,0-án készített kompozit esetén a teljes amplitúdónál az első hónapban emelkedést tapasztaltam, amikor is elérte másfélszeresét, amit egy 70%-os csökkenés követett, majd elérte a 20%-ot a 115. napra. Lassú komponensének részaránya ugyancsak emelkedett és még 2 hónap után is elérte kezdeti értékének 90%-át. Ezután még egy 20%-os csökkenés volt megfigyelhető. A lassú komponens időállandója az első napon mért 1500 ms-hoz képest az első héten 2000 ms körüli értéken mozgott, és még 4 hónap elteltével is 950 ms-os értékkel bírt.

A pH 8,0-on készített minta teljes amplitúdója egy kezdeti esést követően 1 hónapig emelkedő tendenciát mutatott, majd viszonylag gyorsan a felére csökkent és az inkubációs idő végére elérte a 10%-ot. Lassú komponensének részaránya



17. ábra A minták fotokémiai aktivitása különböző pH-n az inkubálási idő függvényében (ld. jelölések az ábrán). Az ábrán az abszorpcióváltozás teljes amplitúdóját (felső ábra), a lassú fázis relatív amplitúdóját (középső ábra) és élettartamát (alsó ábra) mutatom be.

a kezdetekben egy hétig emelkedést mutatott, a következő héten elérte eredeti értékét, amit a második hónap végéig szinte megtartott. A 4. hónap végére 60%-ra csökkent. A lassú komponens időállandója 1 hónapon át átlagosan 1400 ms körül mozgott és a 4. hónap végére is még 810 ms-os élettartammal rendelkezett.

A pH 9,0-es komplex teljes amplitúdója a másfélszeresére nőtt a második napra, amit 2 hétig tartott, majd hirtelen lecsökkent 60%-ra. A 2 és fél hónap után mért adatok kiértékelését a mintán nem tudtam elvégezni, mivel már a kezdetektől igen kis jelet produkált a komplex. Lassú komponensének részaránya 40 nap után mutatott jelentős változást, de még ekkor is elérte a 70%-ot. Időállandója a második hét végére kb. 1540 ms-ig emelkedett, de még a 77. napon is 1000 ms-os volt.

A pH 6,0-os minta teljes amplitúdója egy gyors egy hetes növekedést követően mintegy 80%-kal csökkent le egyenletesen, míg a pH 7,0-esnél egy hónapos emelkedést tapasztaltam, amit szintén egy 80%-os csökkenés követett. A pH 8,0-as kompozit hasonlóan viselkedett a pH 7,0-eshez, összességében 90% körüli volt a teljes amplitúdó változása, a pH 9,0-esnél pedig a stabil egy hónapos megnövekedett értékeket követte ez az esés, amikor is elérte a 60%-ot. Ez utóbbi minta esetén jóval kisebb jeleket sikerült mérnem a többihez képest, aminek oka lehet, hogy a minta készítése során a RC-ok nagy része elvesztette aktivitását a magas pH-nak köszönhetően.

Ha a lassú komponens részarányát nézzük, megfigyelhető, hogy a pH 7,0-es és 8,0-as minták között nincs számottevő különbség, ezek mutatják a legstabilabb és legmagasabb értékeket.

A lassú komponens időállandóját tekintve a kompozitok igen magas értékeket mutatnak és időbeli változásuk mértékében sincs jelentős különbség. Az első napon mért értékek a pH 9,0-es minta kivételével meghaladják az oldatbeli RC 1200 ms-os élettartamát, ahogy azt korábban is tapasztaltam. A pH 7,0-es minta az első hónapban 2000 ms körüli élettartammal rendelkezett.

Összehasonlítva az eredményeket az a következtetés vonható le, hogy a minták stabilitásának szempontjából a 7,0-es pH-n történő preparálás az optimális.

5.1.2 Kémiai kötéssel létrehozott komplexek

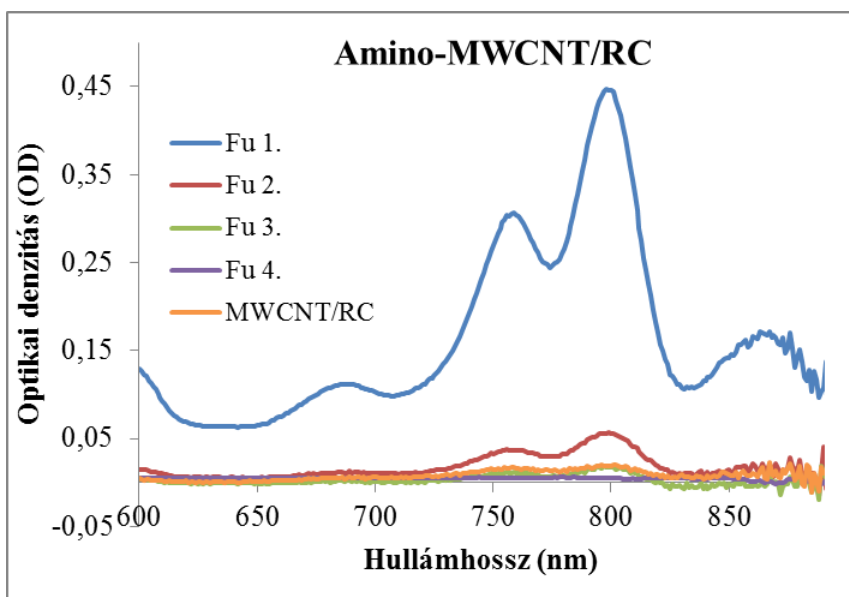
Mivel a fizikai szorpció esetén a RC hordozóhoz való kötődésének orientációs viszonyairól nincs pontos tudomásunk, munkám során feladatomb volt olyan kémiai kötési metódusok átültetése a gyakorlatba, ami a mi laboratóriumi körülményeink között is alkalmazható volt. Ezen kötési eljárások némelyike már ismert az irodalomban különböző fehérjék rögzítésére, a RC-éra is, de a pontos eljárás a mi laboratóriumunk által támasztott követelményekhez még kidolgozásra várt. Ennek során amino- és karboxilcsoporttal funkcionált többfalú szén nanocsövekhez rögzítettem a RC-ot különböző keresztkötőszerek segítségével és vizsgáltam azok fotokémiai aktivitását.

5.1.2.1 RC kötése aminocsoporttal funkcionált többfalú szén nanocsőhöz szulfo-SMCC keresztkötőszerrel

Először az amino-funkcionált szén nanocsőhöz tartozó kötési módszerek kidolgozására fordítottam figyelmet, amelynek egyik lehetősége a szulfo-SMCC keresztkötőszereken keresztül történő immobilizálás (ld. 4.2.1.2 fejezet).

A komplex elkészítésének utolsó lépése a minta mosása centrifugálással azért, hogy a nem kötődött reakciócentrum fehérjét eltávolítsuk a szén nanocső/RC szuszpenzióból. Ennek során először a mosás során vett felülúszók abszorpciós spektrumát mértem UNICAM UV-4 kétsugaras spektrofotométerrel 2 mm-es küvettában 600 és 900 nm között és a mosást mindaddig folytattam, amíg a frakció a RC-ra jellemző csúcsot mutatta 800 nm-en. A felvett spektrumok azt mutatták (18. ábra), hogy a mosások számának növekedésével csökkent a RC mennyisége a felülúszókban, míg a 4. mosásnál már nem mutatta a karakterisztikus csúcsot. Ezután a MWCNT/RC üledéket felfuszpendáltam foszfát pufferben (0,1 M; pH 7,2; 0,006% LDAO), majd azonos körülmények között mértem az abszorpciós spektrumát. A Beer-Lambert törvény alkalmazásával a 800 nm-es csúchoz tartozó amplitúdókból kiszámoltam a RC koncentrációit. Az első felülúszó esetén ez 8 μM , a másodiknál 1 μM , a harmadiknál pedig 0,35 μM volt. A MWCNT/RC szuszpenzióban mért RC

koncentráció ugyancsak 0,35 μM -nak adódott. Ezek együttes értéke megfelel a preparálás során bemért reakciócentrum hígítás utáni koncentrációjának.

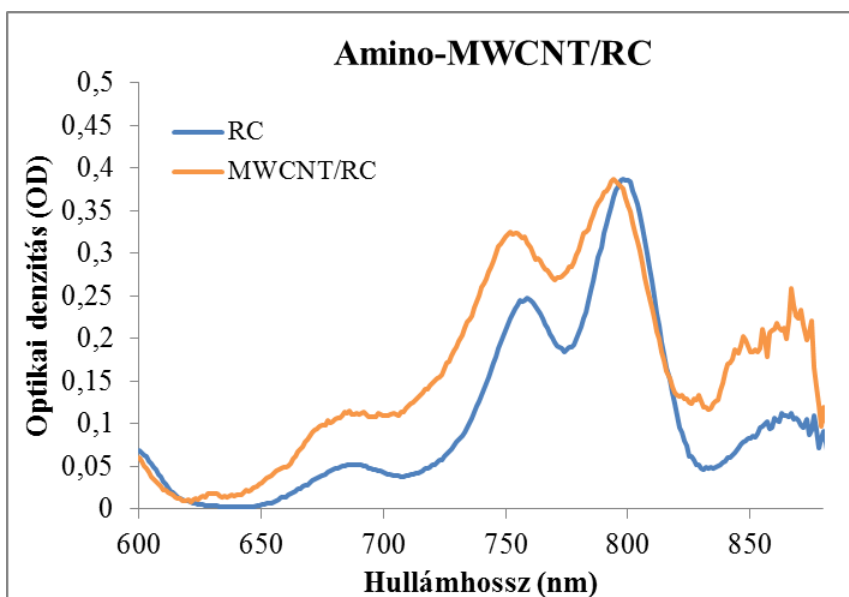


18. ábra Az amino-funkcionált szén nanocső/RC komplex mosás utáni felülúszóinak és a komplexnek az abszorpciós spektruma. A jelölések a felülúszok sorrendjét (Fu 1., 2., 3., 4.) és az amino-funkcionált MWCNT/RC komplexet mutatják.

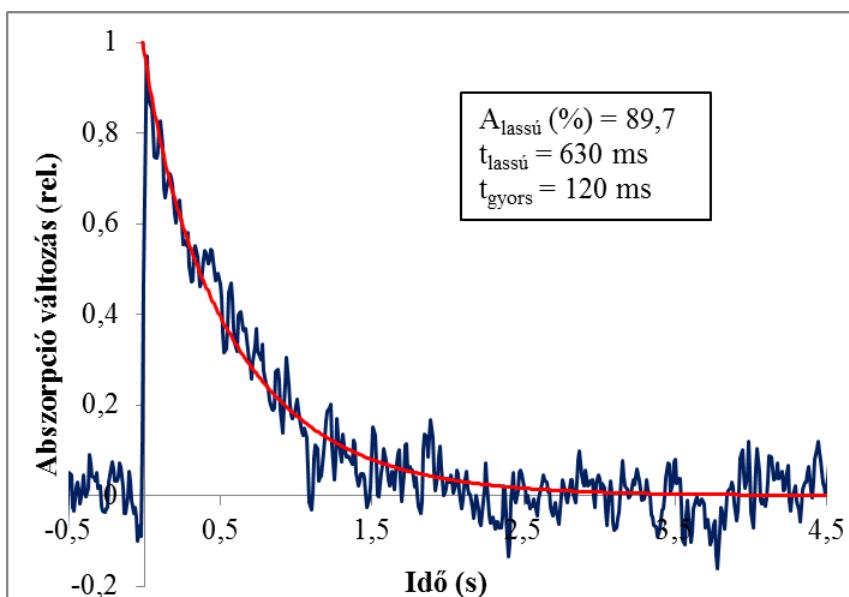
Ezt követően a RC-ot tartalmazó oldathoz és a komplexhez tartozó spektrumokat a 800 nm-es abszorpcióhoz normáltam. A 19. ábra jól mutatja, hogy a kötést követően jelentősen megváltozik a donor környezete a fehérjén belül. A 800 nm-nél mérhető bakterioklorofill monomerre jellemző abszorpciós csúcs keskenyebbnek mutatkozik a RC esetében, valamint a 800 és 860 nm (elsődleges donorra jellemző csúcs) közötti abszorpcióban is látható különbség. Ez azt mutatja, hogy a bakterioklorofill monomer és dimer környékén zajló elektrosztatikus kölcsönhatások jellege megváltozik a fehérje MWCNT-höz való kötését követően.

Miután kimutattam, hogy a RC kötődött a szén nanocsőhöz a szulfo-SMCC keresztkötőszert használatával, első lépésben mértem a komplex fényindukált abszorpcióváltozásának kinetikáját 430 nm-en, majd a multiexponenciális illesztést követően kiszámoltam a lassú és gyors komponensekhez tartozó paramétereket, amely a 20. ábrán látható. Megfigyelhető, hogy a lassú komponens részaránya igen magas, a teljes lecsengés 90%-át teszi ki, 630 ms-os életideje azonban jóval rövidebb, mint a szén nanocső nélküli RC oldatban mérté. Ennek oka lehet, hogy a reakciócentrum három felszínhez közeli szulfhidrilcsoporttal

rendelkezik, de ezekből csak egy a felszínen exponált, így a kötődés megváltoztatja a RC koordinációját.



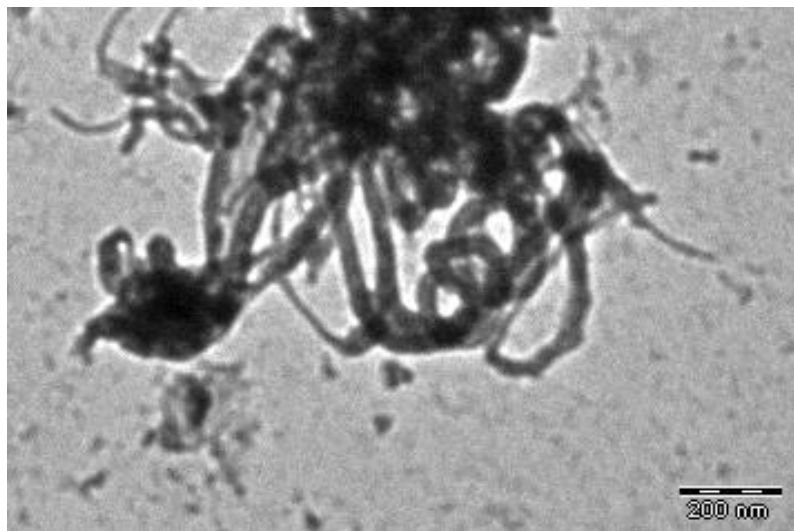
19. ábra Az oldatbeli reakciócentrum és az amino-funkcionált MWCNT/RC komplex egyensúlyi abszorpciós spektruma az összenormálást követően a közeli infravörös tartományban



20. ábra A MWCNT/RC komplex fényindukált abszorpcióváltozása egyszeri telítési fényimpulzussal való gerjesztés után 430nm-nél. Az exponenciális illesztés során kapott számolt görbét a piros vonal jelöli, a hozzá tartozó értékeket pedig feltüntettem.

A kompozit morfológiai jellemzését és egyben a RC rögzítésének sikerességét transzmissziós elektronmikroszkóppal készült felvételekkel

ellenőriztem (21. ábra), amelyek azt mutatták, hogy lehetséges volt a RC-ot az aminocsoporttal funkcionált MWCNT-hez kötni szulfo-SMCC keresztkötőszer segítségével.



21. ábra Az amino-funkcionált MWCNT/RC komplex TEM felvétele

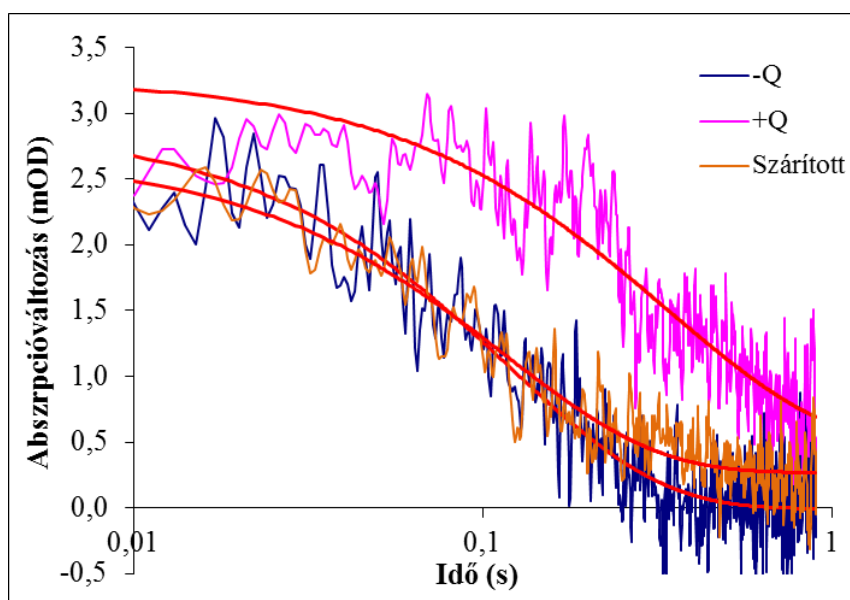
5.1.2.2 RC kötése aminocsoporttal funkcionált többfalú szén nanocsőhöz karbodiimid keresztkötőszerrel

Egy másik lehetőség az amino-funkcionált szén nanocsövekhez való rögzítésre az EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) és NHS (N-hidroxisukcinimid) keresztkötőszer alkalmazása (ld. 4.2.1.2 fejezet).

Hasonlóan az előzőekhez, itt is felvettem minden mosás után a felülúszók abszorpciós spektrumait, majd számoltam az azokhoz tartozó reakciócentrum koncentrációt. A RC jelenlétét jelző 800 nm-es csúcs eltűnését követően az üledékből szuszpendált szén nanocső/RC komplexben rögzített reakciócentrum koncentrációja 1,25 μM -nak adódott. A szulfo-SMCC keresztkötőszer alkalmazásával készült preparátumhoz képest megnövekedett RC mennyiségének oka lehet egyrészt a keresztkötőszer hatékonyabb működése. Másrészt a preparálás során a RC-hoz adott EDC és NHS egymással is összekapcsolja a fehérjét, így nem egyrétegű borítás jön létre a szén nanocsöveken, hanem csomók keletkeznek, amely növeli a reakciócentrum mennyiségét is.

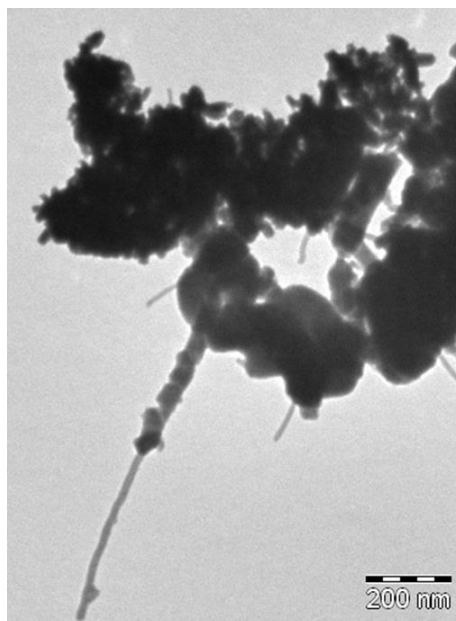
Ezután a minta fényindukált abszorpciós kinetikáját mértem egyetlen telítési fényimpulzus után 430 nm-en. Ezen minta esetén Q_B -mentes reakciócentrumot (a

fehérje preparálása során történik meg eltávolítása) kötöttem a MWCNT-hez. Az 22. ábrán látható görbéből számított paraméterek alapján a komplexben kötött RC-ban csak egy komponens volt jelen a várakozásoknak megfelelően (Q_A). Következő lépésként külső elektron akceptort, kinon mediátort adtam a mérés során a MWCNT/RC komplexhez és ismételten mértem abszorpciós kinetikáját oldatban. Ez esetben azt tapasztaltam, hogy létrejött a második komponens is, melynek élettartam 368 ms volt, részaránya pedig a teljes lecsengés 78,5 %-át adta. Ez jól mutatta, hogy a RC akceptor oldala helyreállítható, a fehérje nem veszítette el aktivitását, azonban lassú komponensének időállandója jelentősen lecsökkent a detergensmicellában, oldatfázisban lévő reakciócentruméhoz képest. A gyors komponens megtartotta 120 ms-os életidejét. Ezután leszárítottam a mintából diaüveglapra, amelynek az exponenciális görbeillesztésből adódó értékei igazolták a Q_B oldal hiányát.



22. ábra A MWCNT/RC komplex fényindukált abszorpcióváltozása egyszeri telítési fényimpulzussal való gerjesztés után 430nm-nél. Az exponenciális illesztés során kapott számolt görbéket a piros vonalak jelölik. Jelölések: -Q: minta a külső kinon mediátor hozzáadása nélkül; +Q: minta a kinon mediátor hozzáadása után; Szárított: az üveglapra szárított minta.

A kötődés létrejöttét TEM segítségével is igazoltam (23. ábra). A felvételen jól láthatók a szén nanocső felületén több rétegben, csomókban rögzült fotoszintetikus reakciócentrum fehérjék (Hajdu és mtsai., 2011).

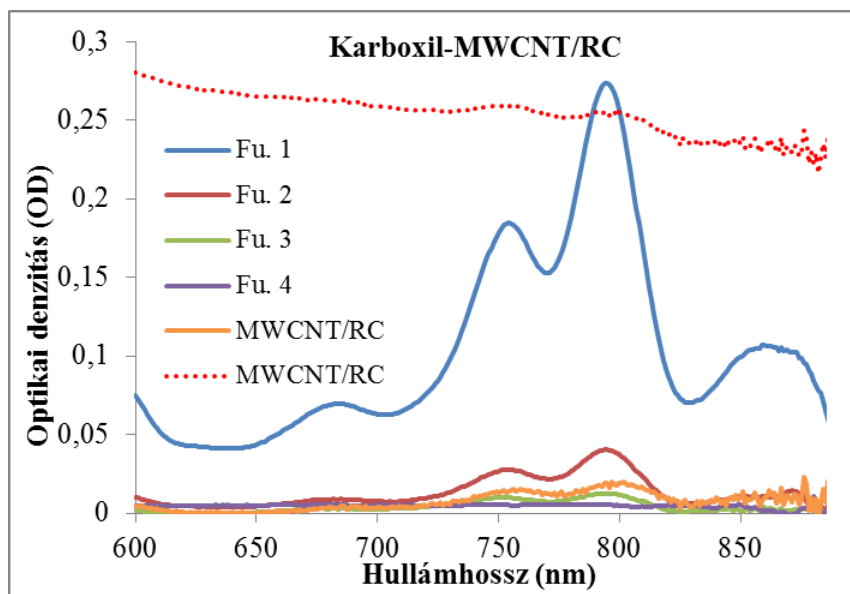


23. ábra TEM felvétel az amino-funkcionált MWCNT felületére EDC és NHS keresztkötőszer alkalmazásával kötött RC-ról

5.1.2.3 RC kötése karboxilcsoporttal funkcionált többfalú szén nanocsőhöz karbodiimid keresztkötőszerezrel

A következő komplex preparálási módszer során karboxil-funkcionált többfalú szén nanocsőhöz kötöttem a fotoszintetikus reakciócentrum fehérjét. Az előző módszerhez hasonlóan EDC és NHS keresztkötőszereket használtam (ld. 4.2.1.2 fejezet), itt azonban a szén nanocsőn lévő karboxil funkciós csoportokat aktiváltam, így megakadályozva a csomók kialakulását.

A kétsugaras spektrofotométerrel felvett abszorpciós spektrumokból ez esetben is kiszámoltam a szén nanocsőhöz kötődött RC koncentrációját, amely $0,35 \mu\text{M}$ -nak adódott. A 24. ábrán láthatók a minta mosását követő frakciók, valamint a minta spektruma. Piros pontozott vonallal jelöltem a komplex spektrofotométerrel eredetileg felvett spektrumát, amelyenél jól látszik, hogy a szén nanocső fényszórása igencsak megemeli a jel amplitúdóját, amelyet a kiértékelés során az alapvonalra korrigáltam.

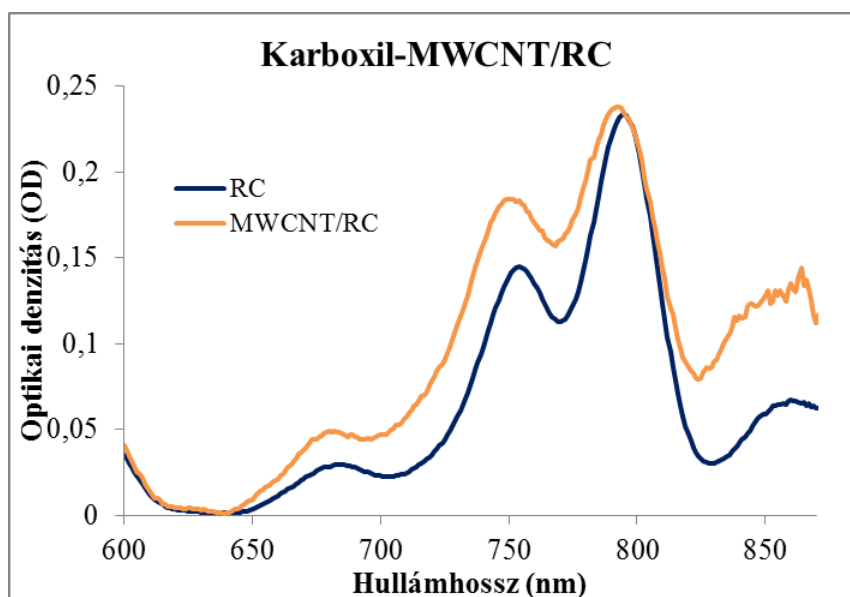


24. ábra A karboxil-MWCNT/RC komplex mosás utáni felülúszóinak és a komplexnek az abszorpciós spektruma. A jelölések a felülúszók sorrendjét (Fu. 1, 2, 3, 4) és a karboxil-MWCNT/RC komplexet mutatják alapvonalra korrigálás előtt (piros pontozott vonal) és után (narancssárga vonal).

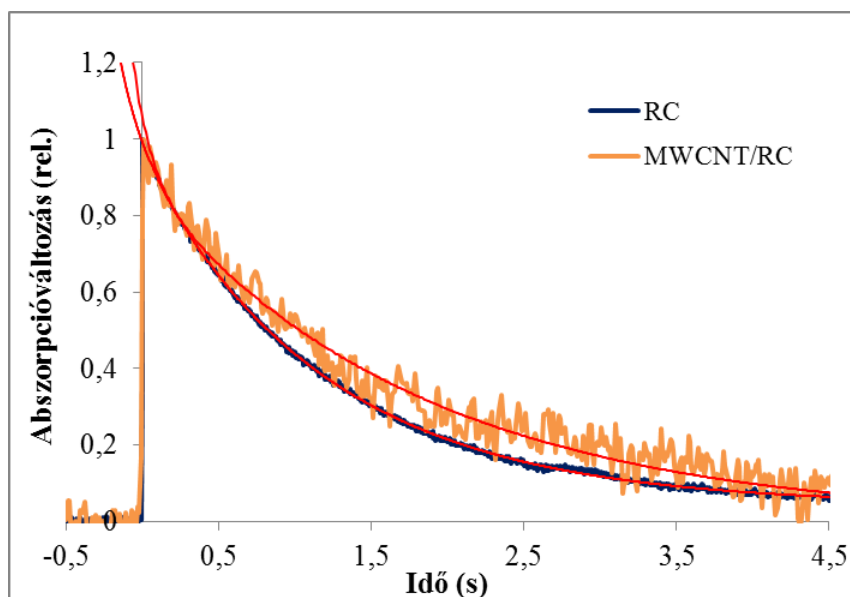
A RC-ot tartalmazó oldat és a komplexhez tartozó 800 nm-es abszorpciós maximumok összenormálását követően itt is jól megfigyelhető a 25. ábrán, hogy a komplexben kötött reakciócentrum donorjának környezete megváltozik a fehérjén belül, a bakterioklorofill monomer és dimer környékén zajló elektrosztatikus kölcsönhatások jellege megváltozik a fehérje szén nanocsőhöz való kötését követően.

Ezután mértem a komplex fényindukált abszorpcióváltozását 430 nm-en és meghatároztam a lassú és gyors komponensekhez tartozó élettidoőket és részarányokat. A 26. ábrán a mért eredményt mutatom be a RC fehérje oldatban mért kinetikájával összehasonlítva. A szén nanocsövet nem tartalmazó reakciócentrum minta esetén a lassú fázis részaránya a teljes lecsengés 92%-át tette kis és 1200 ms-os élettidoővel rendelkezett. Gyors komponense 120 ms-os volt. A karboxil-funkcionált többfalú szén nanocső/RC komplex esetén ezek a paraméterek a következők szerint alakultak: a lassú komponens részaránya 82,6% volt, ami csupán 10%-os eltérést jelez a RC-éhoz képest, élettideje azonban elérte az 1826 ms-ot. Ez jó egyezést mutat a fizikai szorpció esetén mért értékekkel, ami a szén nanocső és a RC között kialakuló kölcsönhatásra utal. Eszerint a szén nanocső hatására megnő a lassú komponens élettideje, azaz a nanocső képes lehet

a gerjesztett elektronok elvezetésére és tárolására. A görbeillesztés itt is jól elvégezhető volt a gyors komponens élettartamának 120 ms-on történő rögzítésével.



25. ábra A reakciócentrum és a karboxil-MWCNT/RC komplex egyensúlyi abszorpciós spektruma a 800 nm-es abszorpciós csúchoz való normálást követően a közeli infravörös tartományban



26. ábra A karboxil-MWCNT/RC komplex és a RC oldat fényindukált abszorpcióváltozása egyszeri telítési fényimpulzussal való gerjesztés után 430nm-nél, a normálást követően. Az exponenciális illesztés során kapott számolt görbéket a piros vonalak jelölik.

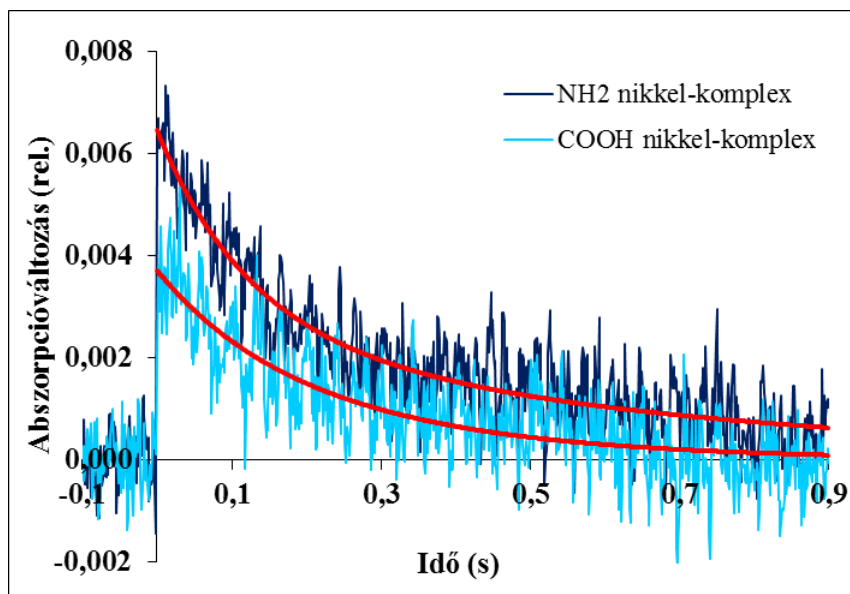
5.1.2.4 RC kötése szén nanocsőhöz nikkel komplexen keresztül

Létrehozható szén nanocső/reakciócentrum komplex nikkel komplexen keresztül is, mindkét féle funkcionált nanocső alkalmazásával. Ebben az esetben NiCl_2 és NTA (Na, Na -bis(karboximetil)-L-lizin) alkalmazásával egy nikkel és nitrilotriecetsav komplex ($\text{NTA} \cdot \text{Ni}^{2+}$) alakítható ki, amely keresztkötőszerek segítségével hozzáköthető a szén nanocsövek funkciós csoportjaihoz. Ekkor a donor oldalán polihisztidinnel jelölt RC-ot alkalmazunk, amely imidazol nitrogénjein keresztül képes specifikusan kötődni a nikkelhez, annak kelátképző tulajdonságainak köszönhetően.

Az irodalomban az amino-funkcionált szén nanocsőhöz történő rögzítés az elterjedt (Lebedev és mtsai., 2008). A specifikus helyeken, genetikai módszerekkel hisztidincsoporttal jelölt RC szilárd hordozóhoz kötésével az orientáció hatása is vizsgálható. Mivel rendelkezésemre állt olyan mutáns baktériumtörzs, amelyben a RC donoroldala polihisztidincsoporttal jelölt, kísérletet tettem ennek amino- és karboxilcsoporttal funkcionált szén nanocsövehez kötésére is. Bízom abban, hogy a bevezető kísérleteim a jövőben folytatódhatnak és hasznos eredményekhez vezetnek majd.

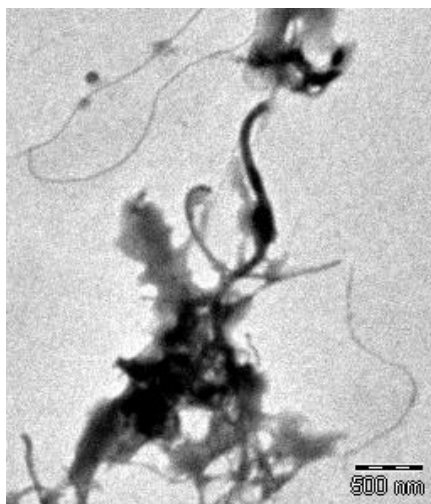
Mindkét mintán mértem a fényindukált abszorpcióváltozást és elvégeztem az exponenciális görbeillesztéseket. A 27. ábrán jól látható, hogy a kapott görbék igen kicsi amplitúdóval rendelkeznek, aminek egyik oka lehet a RC és a szén nanocső között lévő nagyobb kötési távolság a beépülő komplex miatt, illetve a kötés specifikussága. Az előzőleg alkalmazott kötések során a RC felszínén található karboxil- és aminocsoportok bármelyikével megkötődhetett az immobilizációs felszínen, ebben az esetben azonban csak a polihisztidin csoporton keresztül volt képes rögzülni.

Az amino-funkcionált szén nanocső/RC komplex lassú komponensének részaránya 41%, élettideje 625 ms volt, míg ezek a karboxil-funkcionált nanocsöves komplex esetén 77%-nak és 264 ms-nak adódtak. A gyors komponens időállandóját mindkét esetben 120 ms-on rögzítettem. A két komplex közötti különbség adódhat abból, hogy az amino-funkcionált szén nanocső aktiválására használt glutáraldehid keresztkötőszer összekötheti egymással is a nanocsöveket, amely befolyásolhatja a hozzá kötődő RC-ból történő elektron transzportot.



27. ábra Az amino- és karboxil-funkcionált MWCNT/RC komplexek fényindukált abszorpcióváltozása egyszeri telítési fényimpulzussal való gerjesztés után 430 nm-nél. A piros vonalak az exponenciális illesztés során kapott számolt görbéket jelölik.

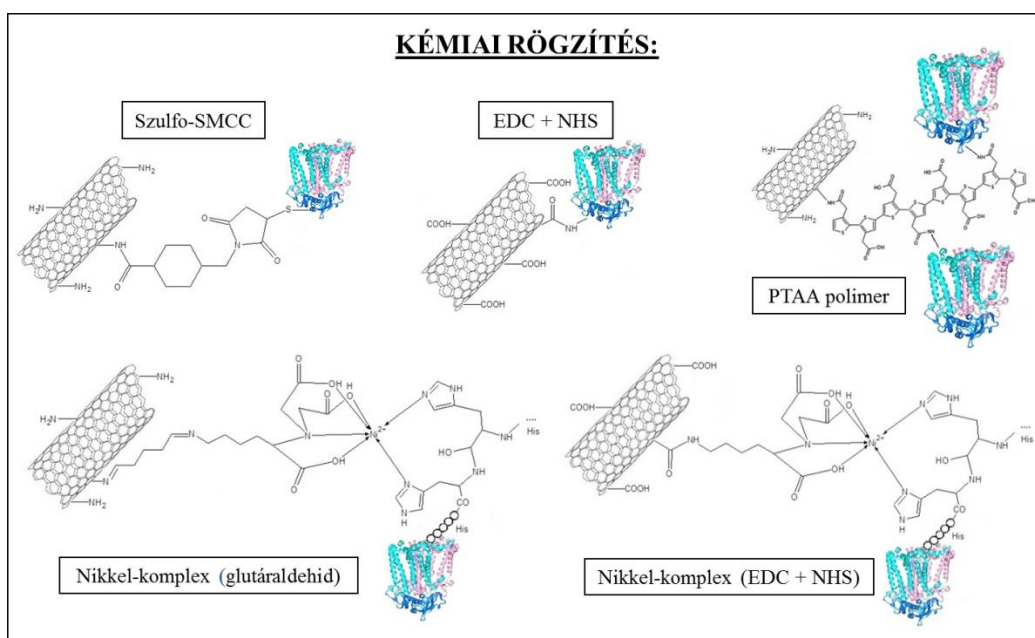
Az aminosocporttal funkcionált szén nanocső/RC kompozitról készült transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel (28. ábra) jól demonstrálja a szén nanocsővekből illetve reakciócentrumból kialakult csomókat, amelyek felületét bevonja a detergens.



28. ábra TEM felvétel az amino-funkcionált MWCNT felületére nikkel komplexen keresztül kötött RC-ről és az azt bevonó detergensről

5.1.2.5 A különböző kémiai kötésekkel létrehozott szén nanocső/RC komplexek aktivitásának összehasonlítása

Miután a különböző kémiai kötésekkel létrehozott komplexek (29. ábra, Nagy és mtsai., 2014) aktivitásának kiértékelését elvégeztem, összehasonlítottam a kapott paramétereket, hogy a kutatás folytatásához legalkalmasabb metódust kiválaszthassam. Az egyik szempont ennek során a komplex lassú fázisának analízálása volt, mivel a Q_B oldal működése jól megmutatja, hogy a szén nanocsőhöz rögzített fotoszintetikus reakciócentrum fehérje aktivitását megtartja-e, illetve hogy ez hogyan változik az oldat fázisú reakciócentrum értékeihez képest.



29. ábra A kémiai kötésekkel létrehozott komplexek sematikus ábráinak összefoglalása (a reakciócentrum fehérje és a szén nanocsövek nem méretarányosak)

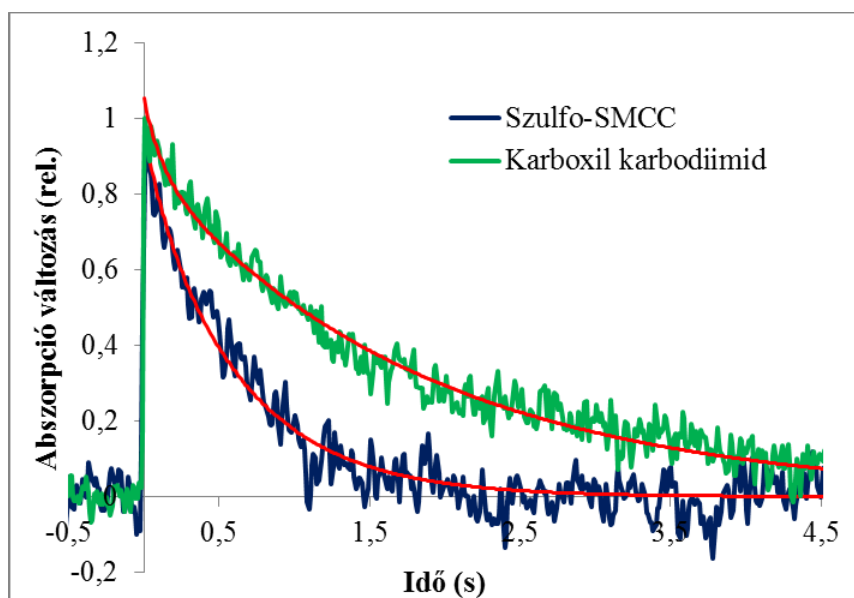
A 3. táblázatban az előzőekben bemutatott mérések eredményeit foglaltam össze. A lassú fázis részarányát és élettartamát figyelembe véve két módszer értékei közelítik meg az oldatbeli RC esetén kapott eredményeket. Az aminocsoporttal funkcionált szén nanocsőhöz szulfo-SMCC keresztkötőszerszel rögzített RC komplex esetében a lassú komponens részaránya igen jó egyezést mutat a reakciócentrum oldatban mért értékével, életideje azonban annak csak a felét éri el. Ezzel szemben a karboxil-funkcionált szén nanocsőhöz EDC+NHS keresztkötőszerek segítségével kötött RC esetén a lassú fázis részarányában csak

csekély, 10%-os eltérés van, élettartama azonban túlszárnyalja a többi minta esetén mért eredményeket.

Minta	A_{\max} (V)	$A_{\text{lassú}}$ (%)	$\tau_{\text{lassú}} (Q_B)$ (ms)
RC	0,34	91,7	1 199
NH ₂ -CNT/RC – szulfo-SMCC	0,97	89,7	630
NH ₂ -CNT/RC – EDC+NHS (+Q)	3,27	78,5	368
COOH-CNT/RC – EDC+NHS	0,02	82,6	1 826
NH ₂ -CNT/RC – nikkel komp.	0,007	41,1	625
COOH-CNT/RC – nikkel komp.	0,004	76,8	264

3. táblázat A RC és a létrehozott MWCNT/RC komplexek egyszeri fényimpulzussal való gerjesztése utáni abszorpcióváltozás teljes amplitúdója, lassú komponensének időállandója és %-os változása az inkubálási idő függvényében. A_{\max} : a $t=0$ s időpontban mért abszorpcióváltozás teljes amplitúdója, $A_{\text{lassú}}$ (%): a lassú komponens részaránya, $\tau_{\text{lassú}} (Q_B)$: a lassú komponens időállandói.

A 30. ábrán a két komplex abszorpciós kinetikája látható 1-re normálva az érzéketes szemléltetés céljából.



30. ábra Az amino- és karboxil-funkcionált MWCNT/RC komplexek fényindukált abszorpcióváltozása egyszeri telítési fényimpulzussal való gerjesztés után 430 nm-nél, 1-re normálva. A piros vonalak az exponenciális illesztés során kapott görbéket jelölik.

A legalkalmasabb módszer kiválasztásánál szempont volt még, hogy olyan eljárást válasszunk, melynek során lehetőség szerint nem kötődnek össze egymással azonos anyagok (legtipikusabban a RC fehérje különböző felületre exponált funkciós csoportjai) így hozva létre csomókat, amelyek akadályozhatják a komplex működését, illetve nehezítik a mérések kivitelezését, értelmezését.

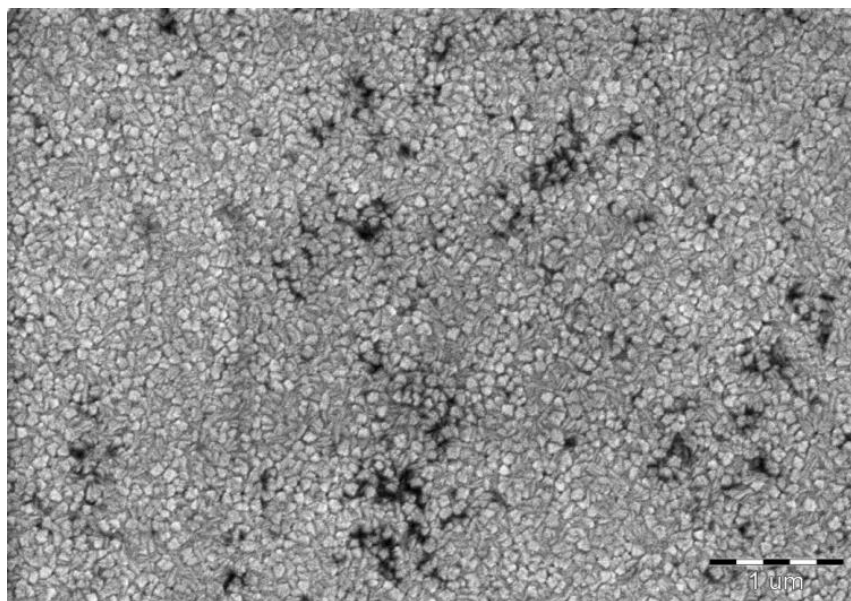
Ezeket a szempontokat figyelembe véve a további kutatások során az említett két metódust alkalmaztam a komplexek kialakításához.

5.1.3 ITO/MWCNT/RC elektród preparálása

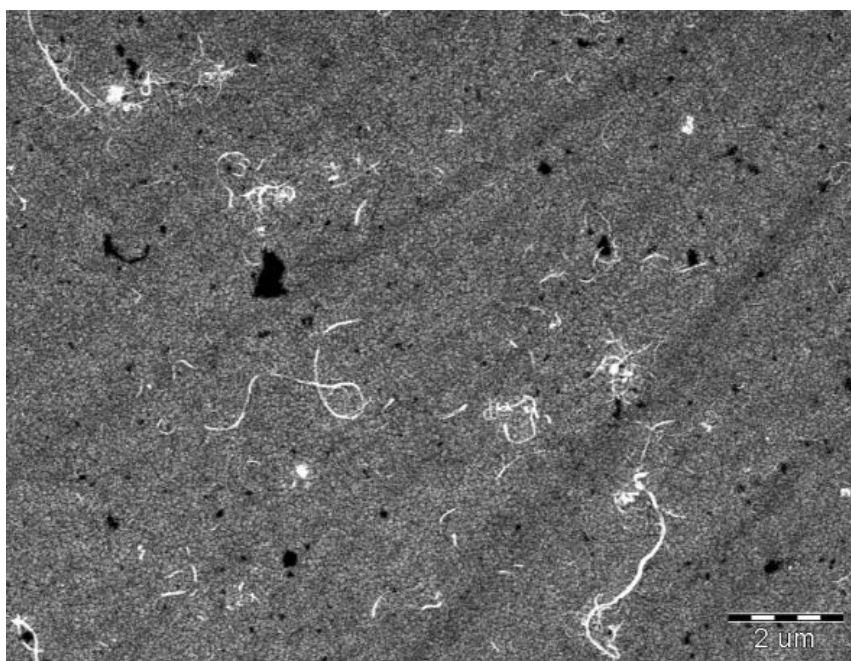
5.1.3.1 RC és szén nanocső rögzítése ITO felületére keresztkötőszerekkel

A kötések vizsgálatát követően következő lépésként elektródok létrehozása volt a célunk a már ismert módszerek segítségével. Ehhez megfelelő alapot biztosított az ITO (indium-ón-oxid), amely az áttetsző vezető oxidok (transmitting conductive oxides, TCOs) vékonyfilmjei közé tartozik és széles körben alkalmazzák a félvezető és elektronikai eszközökben a látható tartományban való átlátszóságának köszönhetően (Bashar, 1998; Granqvist & Hultaker, 2002). Az általunk használt ITO egy jó minőségű boroszilikát-üveglapra vékony rétegben felvitt indium-ón-oxid. A tiszta ITO felszíne mikrokristályos szerkezetű és 3,5-5 nm-es felületi egyenetlenségekkel borított (31. ábra).

Ahhoz, hogy a többfalú szén nanocsövet rögzítsük az ITO felületén, először funkciós csoportokat kell létrehoznunk rajta. Az aminocsoporttal funkcionált szén nanocső esetén ezek szulfhidrilcsoportok voltak, amelyet szilanizálással értünk el. Ezután a már ismert szulfo-SMCC keresztkötőszer használatával rögzítettem a MWCNT-et a felületen. A 32. ábrán az ITO felszínére rögzített szén nanocsövek SEM felvétele látható.

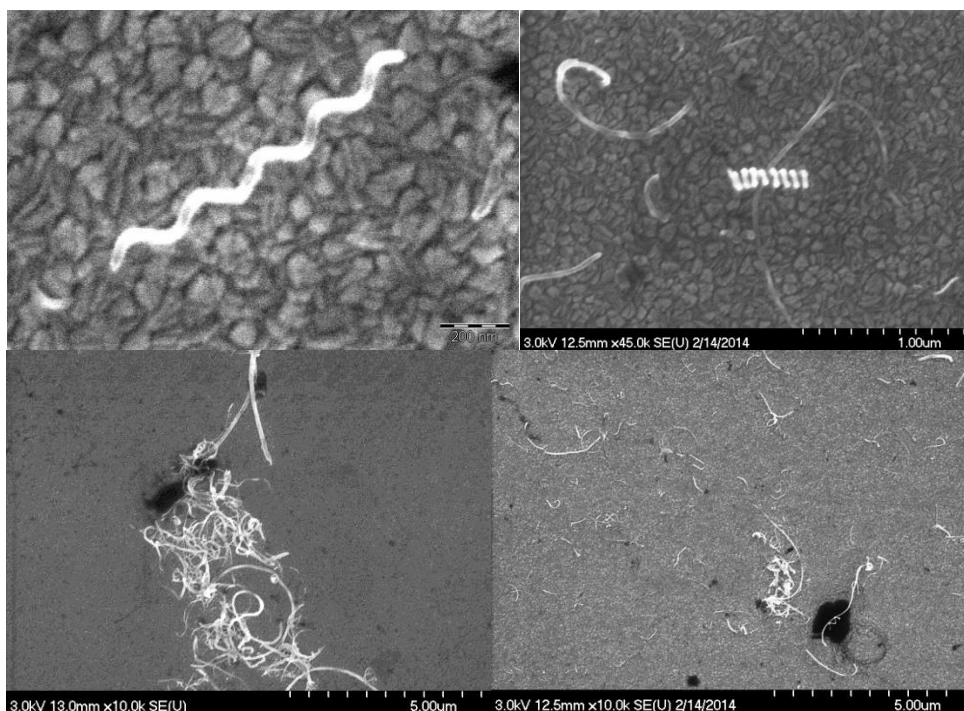


31. ábra Az ITO felületének pásztázó elektronmikroszkópos felvétele



32. ábra Az ITO felületére rögzített amino-funkcionált szén nanocső SEM felvétele

Ugyanígy karboxil-funkcionált MWCNT-et is kötöttem az aminocsoporttal ellátott ITO felszínére EDC és NHS használatával. Ezen minta esetén jól látható a 33. ábrán, hogy milyen változatos formájú és méretű szén nanocsövek találhatók egy-egy preparátumban. A rövidebb szálak a funkcionizálás során alkalmazott kezelések hatására jönnek létre.



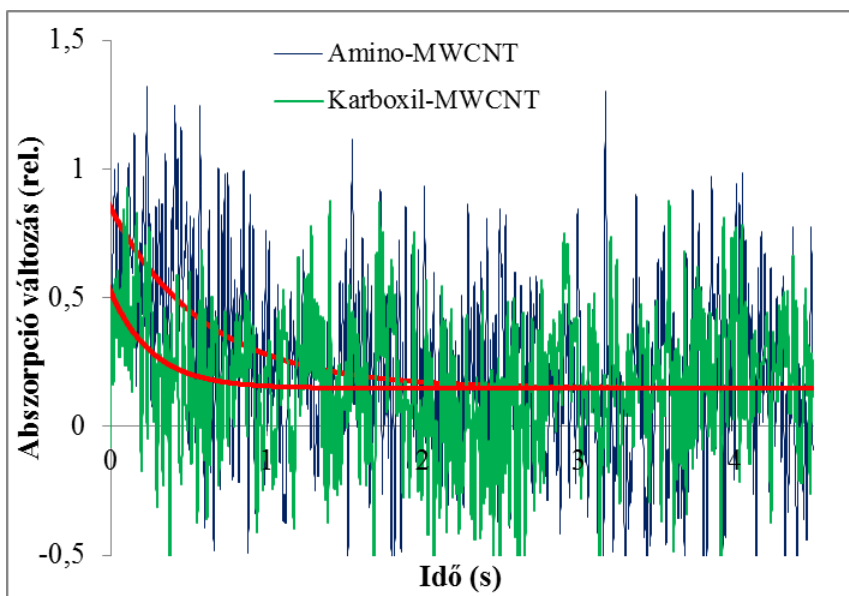
33. ábra Az ITO felületére rögzített karboxil-funkcionált szén nanocső SEM felvétele (párhuzamos preparátumok)

Miután létrehoztuk a ITO/MWCNT elektródot, keresztkötőszerek alkalmazásával aktiváltam újra a funkciós csoportokat. A karboxilcsoporttal funkcionált szén nanocső esetén annak szabadon maradt, aminocsoporttal funkcionált szén nanocső esetén azonban a RC karboxilcsoportjait aktiváltam EDC és NHS hozzáadásával, majd kötöttem a felülethez.

A 34. ábra a minták 430 nm-en mért fényindukált abszorpcióváltozásának kinetikáját mutatja. Az ITO felületén kis mennyiségben jelenlévő RC-nak, valamint a fényszórásnak köszönhetően a mérés csak többszöri ismétlés (10-szeres) átlagolását követően volt értékelhető. A multiexponenciális illesztés során, amelyet a piros vonalak jelölnek, egy komponenst tudtam feloldani mindkét esetben, amelynek élettidejei 600 ms amino-MWCNT esetén és 270 ms karboxil-MWCNT esetén. Ebből azt láthatjuk, hogy a töltésrekombinációs fázis felgyorsul az oldatban mérhető RC paramétereikhez képest, a másodlagos kinonaktivitás megváltozását jelezve. Ennek több oka is lehet: egyrészt oldatban a kinetikát befolyásolja a kinonleválás/bekötődés kinetikája is, amely ebben az esetben nyilvánvalóan nincs jelen, másrészt az elsődleges és a másodlagos kinonok között a ΔG szabadenergia különbség hajtja az előreirányuló elektrontranszfert, ami függ

a kinonok kémiai természetétől és azok környezetétől. Ez utóbbi minden valószínűség szerint különbözik az oldatbeli és a szárított/száraz minták esetén.

A teljes amplitúdóból adódó különbség oka lehet az amino-funkcionált szén nanocsőhöz csomókban kötődő RC, ami így megnöveli a felületre rögzített fehérje mennyiségét.



34. ábra Az ITO/amino- vagy karboxil-funkcionált MWCNT/RC elektródok fényindukált abszorpcióváltozása egyszeri telítési fényimpulzussal való gerjesztés után 430 nm-nél, átlagolva (10 ismétlésből). A piros vonalak az exponenciális illesztés során kapott számolt görbéket jelölik.

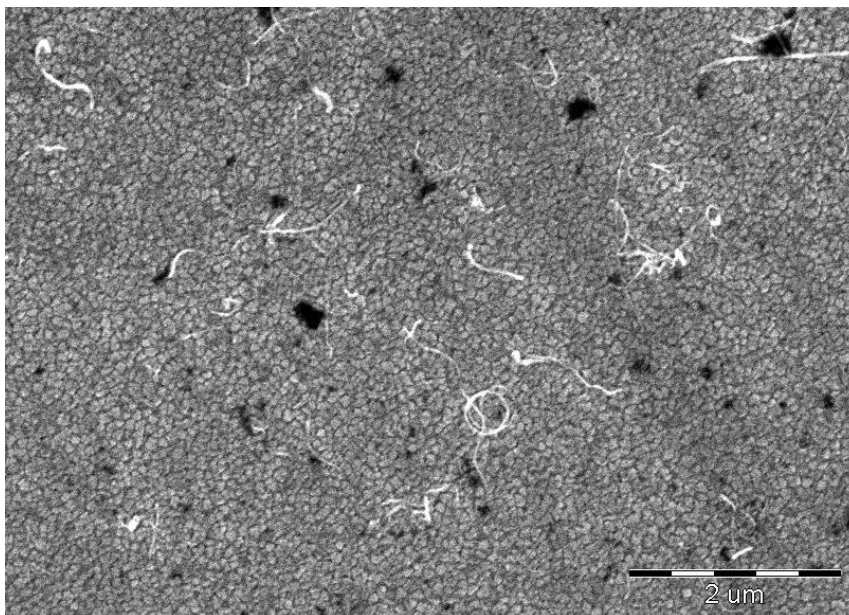
A minták redoxaktivitását elektrokémiai cellában is ellenőriztük, fény hatására fotoáramot termeltek, így modellként alkalmasak lehetnek akár integrált optoelektronikai vagy fotoelektrokémiai hasznosításra is (Szabó és mtsai., 2015). Ilyen vizsgálatok is folynak a csoportunkban, de ezek az eredmények nem ennek a disszertációnak a tárgyát képezik.

5.1.3.2 RC és szén nanocső rögzítése ITO felületére vezető polimeren keresztül

A keresztkötőszerek használatán túl más lehetőségek is adódnak a RC rögzítésére, ilyen például a vezető polimer alkalmazása (ld. 4.2.1.2 fejezet). Ennél a kötésnél aminocsoporttal funkcionált többfalú szén nanocsövet és PTAA (poli(3-tiofén ecetsav)) vezető polimert használtam, majd rögzítettem a komplexet

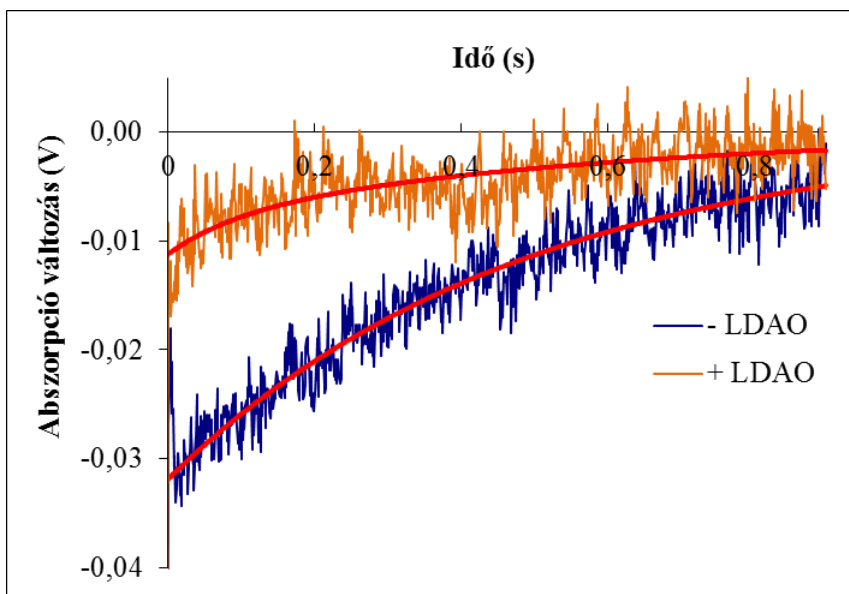
a PDDA-val (Poli(diallildimetilammónium klorid)) kezelt ITO felületére elektrosztatikai kötésen keresztül. A PTAA ebben a rendszerben egyszerre szolgál keresztkötőként és teremt elektromos kapcsolatot az ITO, a MWCNT és a RC között.

A pásztázó elektronmikroszkópos felvétel (35. ábra) az ITO felületére ezzel a módszerrel kötött amino-funkcionált szén nanocsöveket mutatja.



35. ábra Az ITO felületére polimerrel rögzített amino-funkcionált MWCNT SEM felvétele

A 860 nm-nél mért fényindukált abszorpcióváltozás (36. ábra) bizonyította, hogy a komplex ITO felületére történő rögzítése sikeres volt, valamint hogy a RC aktív maradt a preparálást követően is. Az is jól látható, hogy a kötődés hatékonyságát nagymértékben befolyásolja a detergens (LDAO) koncentrációja, azaz hogy a minta preparálása során kidializáljuk-e vagy sem. A multiexponenciális illesztést követően az LDAO mentes (-LDAO) minta görbéje monofázikus jelleget mutat, melynek időállandója 482 ms, ami a RC homogén kötődését jelzi a mintában. Ezzel szemben az LDAO-t tartalmazó minta (+LDAO) heterogén kötődést mutat a görbe bifázikus jellegéből adódóan (Szabó és mtsai., 2012). Lassú komponense a teljes lecsengés 71,5%-át teszi ki, időállandója pedig 570 ms. Ez a megfigyelés megegyezik a fizikai szorpciónál is tapasztaltakkal, miszerint száraz minták esetén a detergens jelenléte hatással van a RC aktivitására, illetve a lassú komponens időállandójára.



36. ábra A PTAA/MWCNT/RC komplex fényindukált abszorpcióváltozása detergenssel (+LDAO) és detergens nélkül (-LDAO). A piros vonalak az exponenciális illesztés során kapott számolt görbéket jelölik.

Ezen minták redoxaktivitását is ellenőriztük elektrokémiai cellában, fény hatására fotoáramot termeltek, így ezek is alkalmasak fotoelektrokémiai hasznosításra. Az eredmények tárgyalására azonban nem térnek ki, mert nem ennek a disszertációnak a tárgyát képezik.

5.2 Szén nanocső/tormaperoxidáz enzim kompozitok

A H_2O_2 jelenlétének és mennyiségének pontos és megfelelő érzékenységgű meghatározása esszenciális a környezeti és gyógyszeripari minták analízise során, ugyanis élő sejtekben többféle oxidáz enzim által katalizált reakció termékeként jelenik meg ez a vegyület. Detektálására nagyon ígéretes és hatékony út lehet az enzimfehérje aktivitásán alapuló bioszenzorok kialakítása a biológiai molekulák érzékenysége, szelektivitása és specifikusságának köszönhetően. Erre a célra igen gyakran használt enzim a tormaperoxidáz, mivel képes H^+ atomok és például xenobiotikumok oxidálására H_2O_2 jelenlétében, régóta tanulmányozott, valamint jól ismert a szerkezete és működése. Annak érdekében, hogy az általam készített MWCNT/HRP komplex és ITO/MWCNT/HRP elektród H_2O_2 kimutatási

határát (limit of detection - LOD) meghatározom, kalibrációkat végeztem abszorpciós és emissziós (fluoreszcencia) spektroszkópiával. Az enzimelektród működését ciklikus voltammetriával is igazoltam. A dolgozatban szereplő ábrák minden esetben reprezentatív, tipikus mérési eredményeket mutatnak be.

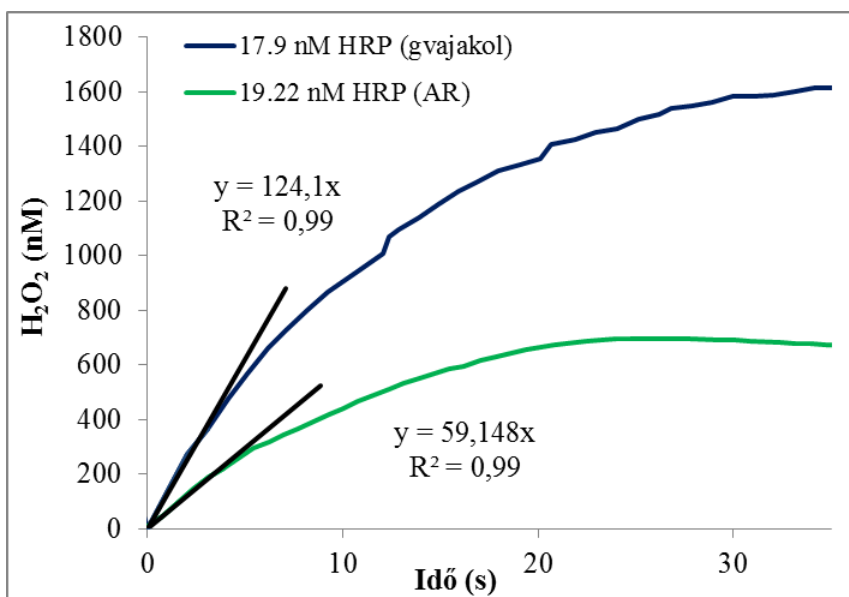
5.2.1 Az enzim aktivitása oldatban

Az oldatbeli tormaperoxidáz enzimaktivitásának meghatározásához abszorpciós kinetikai és fluoreszcencia méréseket is végeztem. Habár a fluoreszcencia mérés sokkal érzékenyebb módszer az abszorpciómérésnél, ez utóbbi lehetőséget ad a gvajakol és az amplex red koncentrációjának megállapítására, így a hidrogén-peroxid koncentrációváltozása meghatározható abszolút értékben, hiszen a tetragvajakol és a rezorufin moláris extinkciós koefficiensei ismertek (ld. 4.3.5 fejezet).

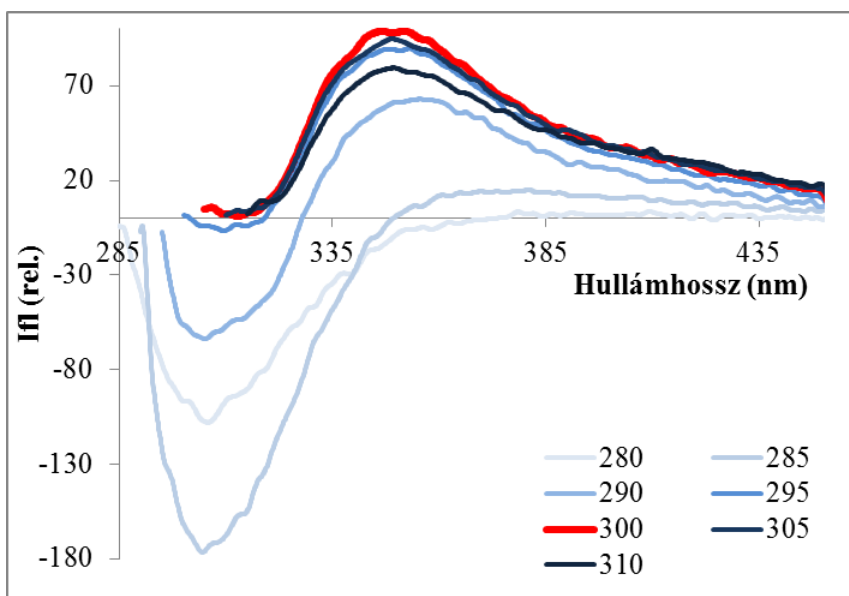
Első lépésként a tetragvajakol és a rezorufin enzimreakció során végbemenő abszorpcióváltozásának kinetikáját mértem különböző enzimkoncentrációk mellett, majd minden esetben kiszámítottam a H_2O_2 bomlásának kezdeti sebességét. A 37. ábrán a 17,9 nM (gvajakol hozzáadása esetén) és a 19,2 nM (AR hozzáadása esetén) HRP koncentrációhoz tartozó tipikus méréseket mutatom be. Az ábra a tetragvajakol és a rezorufin abszorpcióváltozása alapján készült foszfát puffer oldatban (0,1 M; pH 7,0). A H_2O_2 fogyását a Beer-Lambert törvény alapján számoltam ki.

Ezután méréseket végeztem, hogy beállítsam a tetragvajakol fluoreszcencia változásának nyomon követéséhez szükséges gerjesztési és emissziós hullámhosszakat a spektrofluoriméteren. Ennek meghatározására az irodalomban található értékekhez közeli hullámhosszakon párhuzamosan mértem a gvajakol és a már kialakult tetragvajakol fluoreszcenciáját. Az azonos hullámhosszakhoz tartozó gvajakol és tetragvajakol spektrumok különbségéből a 38. ábrán látható differenciaspektrumokat készítettem és meghatároztam a méréshez szükséges hullámhosszakat. A két komponens maximum csúcsai közötti legnagyobb különbség a 300 nm-es gerjesztési és a 350 nm-es emissziós hullámhosszra adódott.

Az amplex red és rezorufin esetén is hasonlóan jártam el, ott ezek az értékek 545 nm (gerjesztési) és 585 nm (emissziós) voltak.



37. ábra A redukált H_2O_2 mennyisége 17,9 nM (gvajakol) és 19,2 nM (amplex red) HRP hozzáadásával az idő függvényében. Az ábrán látható a reakció kezdeti meredeksége és az egyenes egyenlete, valamint az illesztés pontossága (R^2).



38. ábra A tetragvajakol-gvajakol fluoreszcencia emissziós spektrumok különböző gerjesztési hullámhosszakon mért különbsége

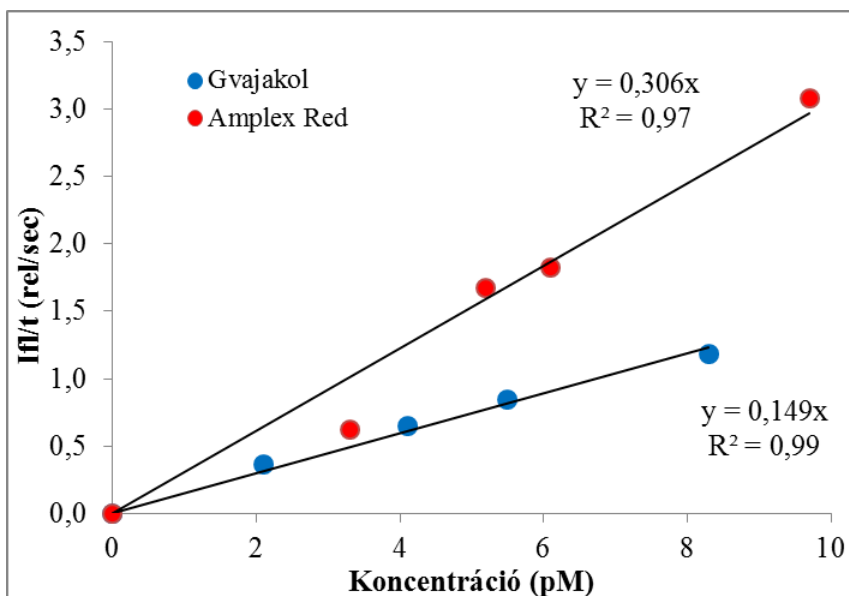
Ezt követően mértem a gvajakol/tetragvajakol és AR/rezorufin átalakulások fluoreszcenciáját ugyanazokon az enzimkoncentrációkon, mint amelyeket az abszorpcióváltozás mérése során használtam, majd kiszámoltam az egyes

koncentrációkhoz tartozó fluoreszcencia változások kezdeti meredekségét, amelyet a 39. ábrán mutatok be. A kapott pontokra egyenest illesztettem, amelynek egyenletét felhasználva a MWCNT/HRP komplexekben rögzített tormaperoxidáz koncentrációja kiszámolható lehetne a minta által eloxidált szubsztárok fluoreszcencia változásához tartozó kezdeti sebességek meghatározásával. Ez azonban csak durva megközelítése lehet a pontos értékeknek, hiszen egyrészt nem tudjuk, hogy a szén nanocsőhöz való rögzítése hogyan változtatja meg az enzim aktivitását, milyen orientációban kötődik meg a komplexben, illetve hogy a szén nanocső fényelnyelése és ülepedése milyen hatással van a mért jel kinetikájára.

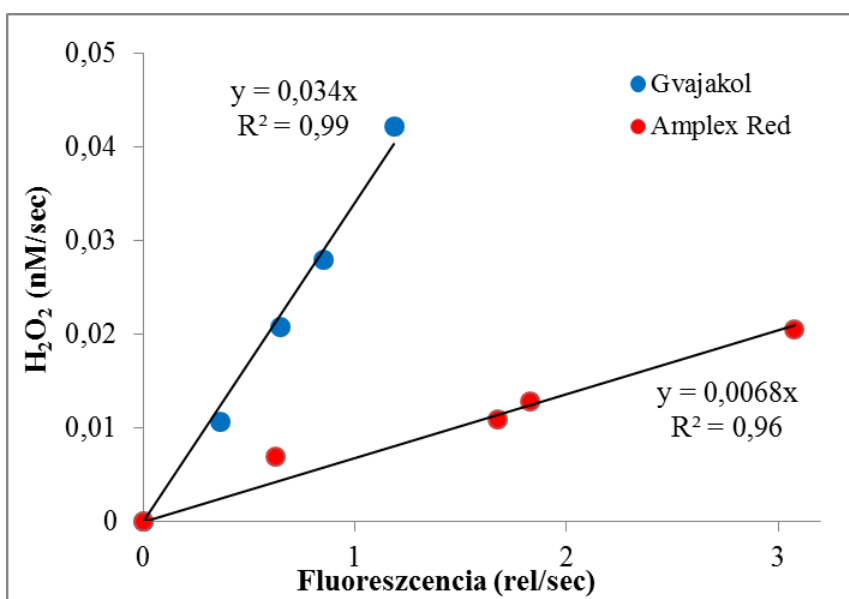
Az abszorpció és fluoreszcencia mérések során kapott eredményekből készítettem egy egyesített kalibrációs egyenest, amely az ugyanazon enzimkoncentrációkhoz tartozó fluoreszcencia változások kezdeti meredekségét mutatja a H_2O_2 bomlási sebességének függvényében (40. ábra). A pontokra illesztett egyenes így megadja a különböző fluoreszcencia változásokhoz tartozó hidrogén-peroxid fogyás sebességét.

A kalibrációk segítségével meghatároztam az oldatban lévő HRP H_2O_2 redukáló sebességét, amely gvajakol esetén $124 \text{ nM H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$, AR esetén pedig $56 \text{ nM H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$ volt. A koncentrációfüggés kiszámítását követően meghatároztam a HRP enzimaktivitását oldatban, amely gvajakol esetén $7 \text{ M [H}_2\text{O}_2]/(\text{M [HRP]} \cdot \text{sec})$ -nak ($r^2 = 0,99$), AR esetén pedig $3 \text{ M [H}_2\text{O}_2]/(\text{M [HRP]} \cdot \text{sec})$ -nak ($r^2 = 0,97$) adódott.

A továbbiakban ezeket a kalibrációkat használtam a komplexek kimutatási határának meghatározásához, valamint számoltam az ezekből adódó, becsült enzimkoncentrációját és enzimaktivitását.



39. ábra A fluoreszcencia változás kezdeti meredeksége az enzimkoncentráció függvényében. A pontokra illesztett egyenesek egyenleteit és az illesztés pontosságát (R^2) is feltüntettem.



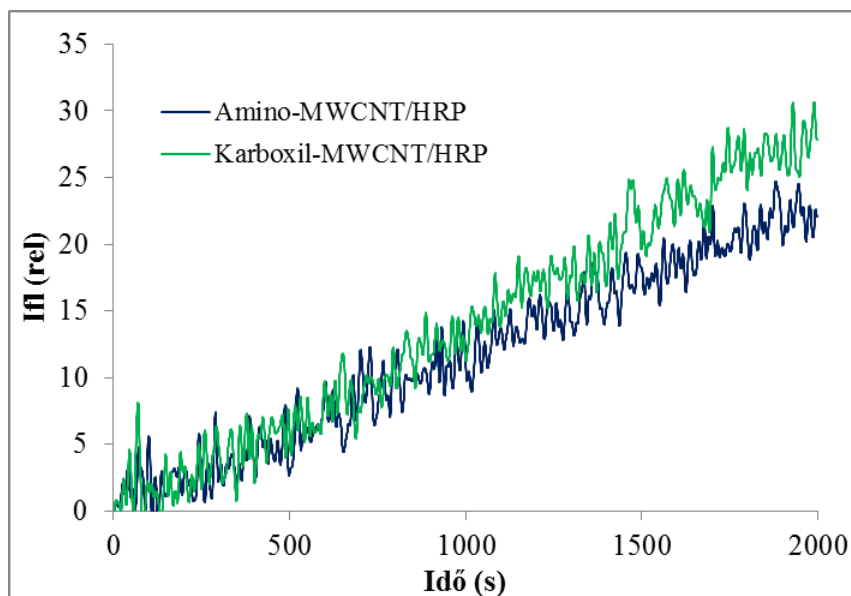
40. ábra Az azonos enzimkoncentrációkhoz tartozó H_2O_2 fogyás sebessége a fluoreszcencia változás kezdeti meredekségének függvényében. A pontokra illesztett egyenesek egyenleteit és az illesztés pontosságát (R^2) is feltüntettem.

5.2.2 HRP kötése amino- és karboxilcsoporttal funkcionált szén nanocsőhöz

Az enzimreakció termékének fluoreszcenciás mérése két okból is praktikus ebben a rendszerben. Egyrészt a fluoreszcencia változásának követése érzékenyebb mérést tesz lehetővé, mint az abszorpcióváltozás mérése, másrészt a MWCNT/HRP komplex fényszórási tulajdonságai miatt a Beer-Lambert törvény nem alkalmazható direkt módon a koncentráció abszorpciómérésével történő meghatározására.

A fotoszintetikus reakciócentrum fehérjéhez hasonlóan a tormaperoxidáz enzim is rendelkezik a felszínén olyan funkciós csoportokkal, amelyeken keresztül köthetővé válik amino- és karboxil-funkcionált szén nanocsőhöz egyaránt. Munkám során ezért először kísérletet tettem mindkét féle komplex létrehozására (4.2.2.1 fejezet).

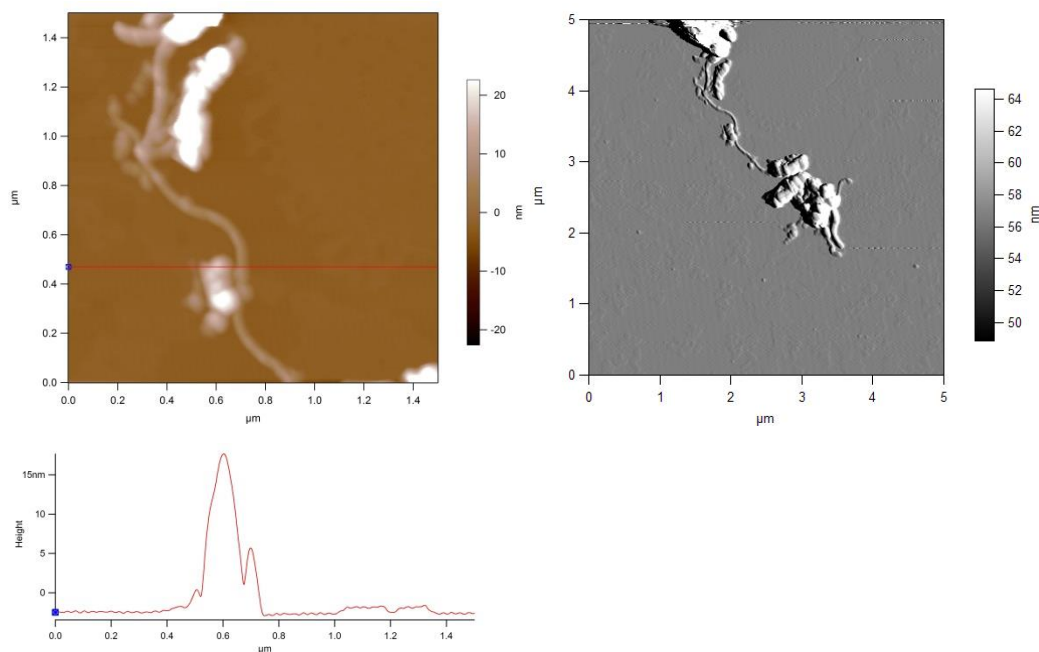
Az amino-funkcionált szén nanocsőhöz való rögzítés során alkalmazott glutáraldehid egy olyan homobifunkcionális keresztkötőszer, amely $-CH=N-C-$ (Shiff bázis) kötést (Estephan és mtsai., 2011), míg a karboxil-funkcionált szén nanocsőnél alkalmazott karbodiimid $-CO-NH-$ (savamid) kötést hoz létre. Miután létrehoztam a két komplexet, mértem az általuk eloxidált gvajakol fluoreszcenciáját H_2O_2 hozzáadása után (41. ábra). Nem mutatkozott számottevő különbség a két görbe között, azonban a GTA alkalmazásánál felmerült a már korábban is említett probléma, miszerint akár a szén nanocsővön lévő, akár az enzim felületén elhelyezkedő aminocsoportokat aktiváljuk, azok egymással is összekötődhetnek és csomók jöhetnek létre. A szén nanocső aktiválása során ez a peroxidáz számára hozzáférhető szabad aminocsoportok számát csökkenti, valamint a megvilágítás során leárnyékolhatja az odakötött HRP-t. Ennek kiküszöbölésére a továbbiakban csak a karboxil-funkcionált szén nanocsőből és tormaperoxidázból álló komplexet készítettem el.



41. ábra Az amino-MWCNT/HRP és a karboxil-MWCNT/HRP komplexek által eloxidált gvajakol (tetragvajakol) fluoreszcenciája az idő függvényében

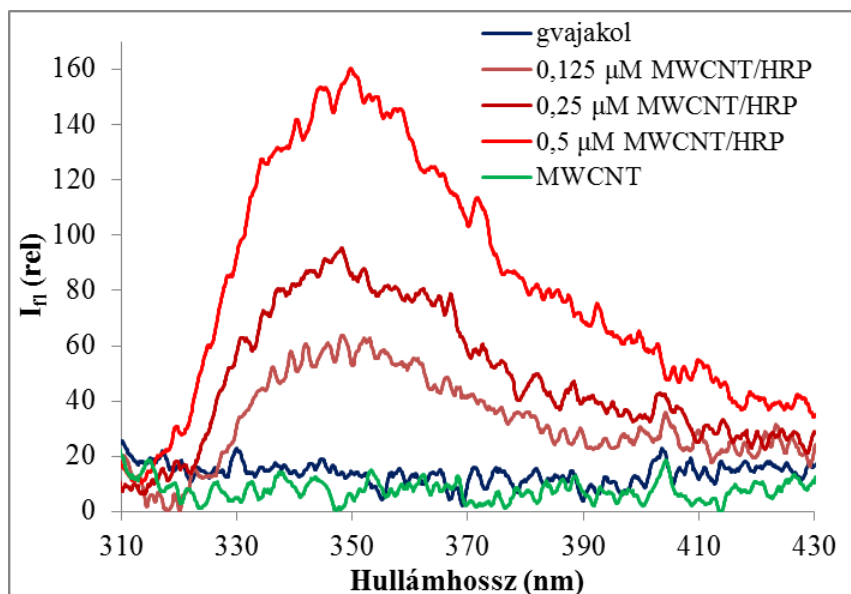
5.2.3 A MWCNT/HRP komplex enzimaktivitása

A létrehozott karboxil-MWCNT/HRP kompozit morfológiai jellemzését és a tormaperoxidáz rögzítésének hatékonyságát AFM-mel készült felvételekkel ellenőriztem (42. ábra). Az AFM felvételek azt mutatják, hogy lehetséges volt a HRP-t a karboxil-funkcionált MWCNT-höz kötni karbodiimid (EDC) és szukcinimid (NHS) keresztkötő molekulák segítségével. A HRP átlagos átmérője 2,5-3 nm (Herren és mtsai., 1997), amely az ábrán bemutatott skála szerint jó egyezést mutat a mi komplexünkben összeálló tormaperoxidázok által mutatott értékekkel. Ebből arra lehet következtetni, hogy a HRP-ok kémiai kötással kapcsolódnak a szén nanocsőhöz.



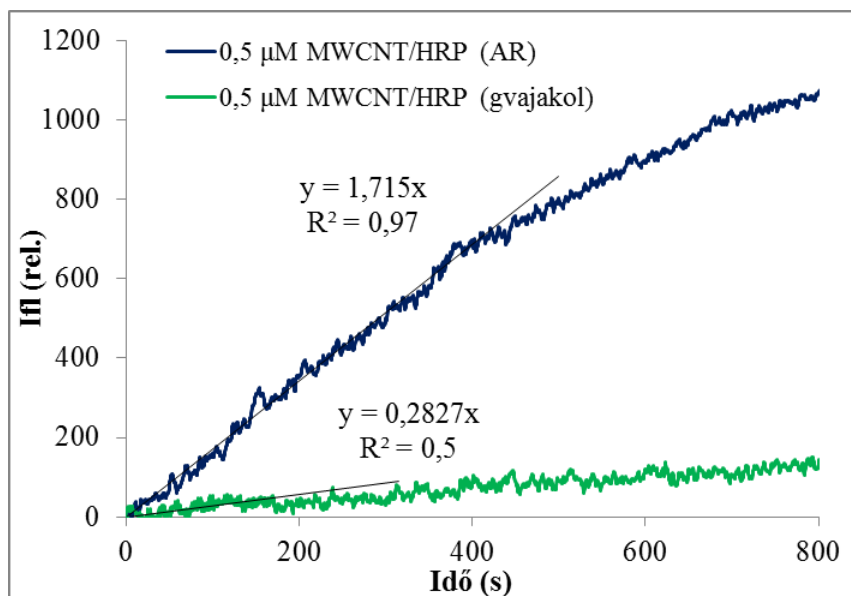
42. ábra A karboxil-MWCNT/HRP komplexről készült AFM felvételek és magasságkép

A morfológiai jellemzést követően fluoreszcencia méréseket végeztem a komplexen gvajakol hozzáadásával, melynek során először a spektrumokat vettem fel. A 43. ábrán a rendszerhez különböző mennyiségben hozzáadott MWCNT/HRP komplex által átalakított tetragvajakol spektrumok láthatók az enzimreakció telítési szintjének elérése követően, amikor is a reakciósebesség maximális (legalább 15 perc eltelte után), 300 nm gerjesztési hullámhossznál. Az adott mérésnél az alkalmazott komplex mennyiségekkel arányos mennyiségben adtam hozzá a H_2O_2 -t és gvajakolt a rendszerhez. A megnövekedett fluoreszcencia egyértelműen mutatja a komplex enzimaktivitását és bizonyítékként szolgál a tormaperoxidáz jelenlétére a kompozitban, valamint hogy aktív centruma hozzáférhető maradt a szubsztrátok számára a kötődés után is. Referenciaként végeztem mérést szén nanocsővel, gvajakol jelenlétében hidrogén-peroxid hozzáadását követően, amely nem mutatott fluoreszcencia növekedést, jelezve, hogy a MWCNT maga nem járul hozzá a gvajakol oxidációjához. Ugyanakkor a tapasztalatok azt mutatták, hogy a szén nanocső megvilágítását követően a fény egy részét elnyeli, így csökkentve a fluoreszcencia hatásfokát. Végeztem mérést a komplexen gvajakol jelenlétében szintén, itt azonban nem adtam hidrogén-peroxidot a rendszerhez. Ebben az esetben sem tapasztaltam változást a fluoreszcenciában, amely azt mutatja, hogy a HRP önmagában nem oxidálja a gvajakolt.



43. ábra A MWCNT/HRP komplex által eloxidált gvajakol (tetragvajakol) emissziós spektruma reakció előtt (gvajakol) és után különböző komplex inkubációs koncentrációk esetén, valamint a karboxil-funkcionált szén nanocső szuszpenzió esetén

Következő lépésként mértem a komplexhez adott gvajakol és amplex red fluoreszcencia változását a H_2O_2 hozzáadását követően. A 44. ábrán a $0,5 \mu\text{M}$ inkubációs koncentrációjú MWCNT/HRP komplex esetén mért görbék láthatók mindkét szubsztrát esetében, illetve azok kezdeti meredeksége és az egyenesek egyenletei. Az elkészített kalibrációk segítségével az itt kapott értékekből kiszámoltam, hogy az általam készített komplex milyen sebességgel képes a hidrogén-peroxidot redukálni. A mi kísérleti körülményeink között ez $9,6 \text{ pM } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$ volt gvajakol és $12 \text{ pM } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$ amplex red esetén. Ez az eredmény 6-4 nagyságrenddel jobb értékeket mutatott, mint HRP oldat esetén ($124 \text{ nM } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$ (gvajakol) és $56 \text{ nM } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$ (AR)). A kötődött HRP mennyiségét is kiszámoltam a kalibrációk felhasználásával, de ezek csak becslő értékek, mivel a pontos meghatározás problémás a már korábban említett okok miatt. A számolt paraméterek azonban gvajakol esetén $1,9 \text{ pM}$, amplex red esetén pedig $5,6 \text{ pM}$ HRP-nek adódtak. Ezekből kiszámoltam az ezekhez tartozó becslő enzimaktivitást, amely gvajakol alkalmazásakor $5 \text{ M } [\text{H}_2\text{O}_2]/(\text{M } [\text{HRP}] \cdot \text{sec})$, AR alkalmazásakor pedig $2 \text{ M } [\text{H}_2\text{O}_2]/(\text{M } [\text{HRP}] \cdot \text{sec})$ volt.

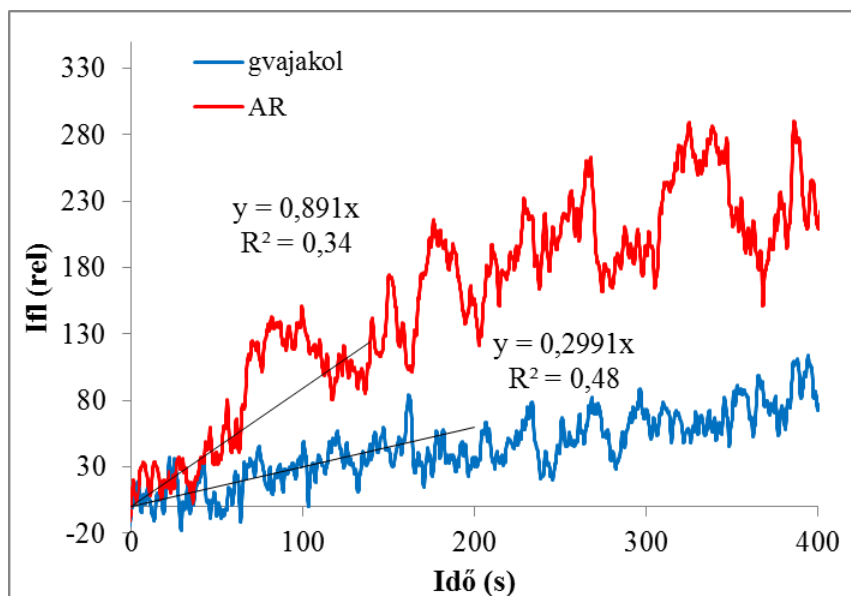


44. ábra A 0,5 μM inkubációs koncentrációjú MWCNT/HRP komplex által eloxidált gvajakol és amplex red (AR) fluoreszcenciája az idő függvényében. Az ábrán látható a reakció kezdeti meredeksége és az egyenes egyenlete, valamint az illesztés pontossága (R^2).

5.2.4 A ITO/MWCNT/HRP elektród enzimaktivitása

Az oldatban történő méréseket követően célom volt az enzim rögzítése szilárd hordozóhoz is, így hozva létre elektródot, amely lehetővé teszi későbbi alkalmazását érzékeny optikai és/vagy elektrokémiai H_2O_2 bioszenzorként (a preparálás lépéseit ld. 4.2.2.2 fejezet).

Először a minta által eloxidált hidrogén donorok fluoreszcenciáját mértem a már ismert rendszerben. Az elektródot egy 1 cm-es küvettába helyeztem, amely gvajakolt/amplex redet tartalmazott foszfát pufferben (0,1 M; pH 7,0). Behelyeztem a fluoriméterbe, majd a reakció beindításához hozzáadtam a H_2O_2 -ot. A 45. ábrán a mért fluoreszcencia görbék láthatók a két donor esetén, valamint a kezdeti meredekségükhöz tartozó egyenesek és azok egyenletei.



45. ábra A MWCNT/HRP/ITO elektródok által átalakított tetragvajakol (gvajakol) és a rezorufin (AR) fluoreszcenciája. Az ábrán látható a reakció kezdeti meredeksége és az egyenes egyenlete, valamint az illesztés pontossága (R^2).

A kalibrációk alapján a minták fluoreszcenciájának meredekségéből itt is kiszámítható a H_2O_2 bomlásának sebessége. Ez a gvajakol esetén 10 pM H_2O_2 /sec-nak, AR esetében pedig 6 pM H_2O_2 /sec-nak adódott. A kötődött HRP becsült mennyisége 2 pM (gvajakol), illetve 2,9 pM (AR) esetén, így az enzimaktivitás hozama 5 M $[H_2O_2]/(M [HRP] \cdot sec)$ volt gvajakol és 2,1 M $[H_2O_2]/(M [HRP] \cdot sec)$ AR felhasználásával.

A 4. táblázatban összesítettem az oldatban lévő HRP, a komplex és az elektród esetén kapott értékeket. Ha a kalibrációk alapján becsült értékeket is számításba vesszük, azt látjuk, hogy gvajakol alkalmazása esetén érzékenyebb mérés érhető el, hiszen kisebb HRP koncentráció esetén is szinte ugyanakkora vagy nagyobb sebességgel redukálja az enzim a H_2O_2 -ot. Azt is jól mutatják a kapott értékek, hogy a HRP enzimaktivitása a szén nanocsőhöz való rögzítést követően minden esetben kb. harmadára csökkent, de gvajakol esetén a HRP aktivitása nagyobb volt mindhárom mérés során, mint az amplex red alkalmazásával.

A kimutatási határt (LOD) tekintve megállapíthatjuk, hogy az általunk alkalmazott rendszerben a létrehozott komplexek nagyságrendekkel kisebb, akár néhány pM-os koncentrációjú hidrogén-peroxid kimutatására is képesek az oldatbeli HRP-hez képest.

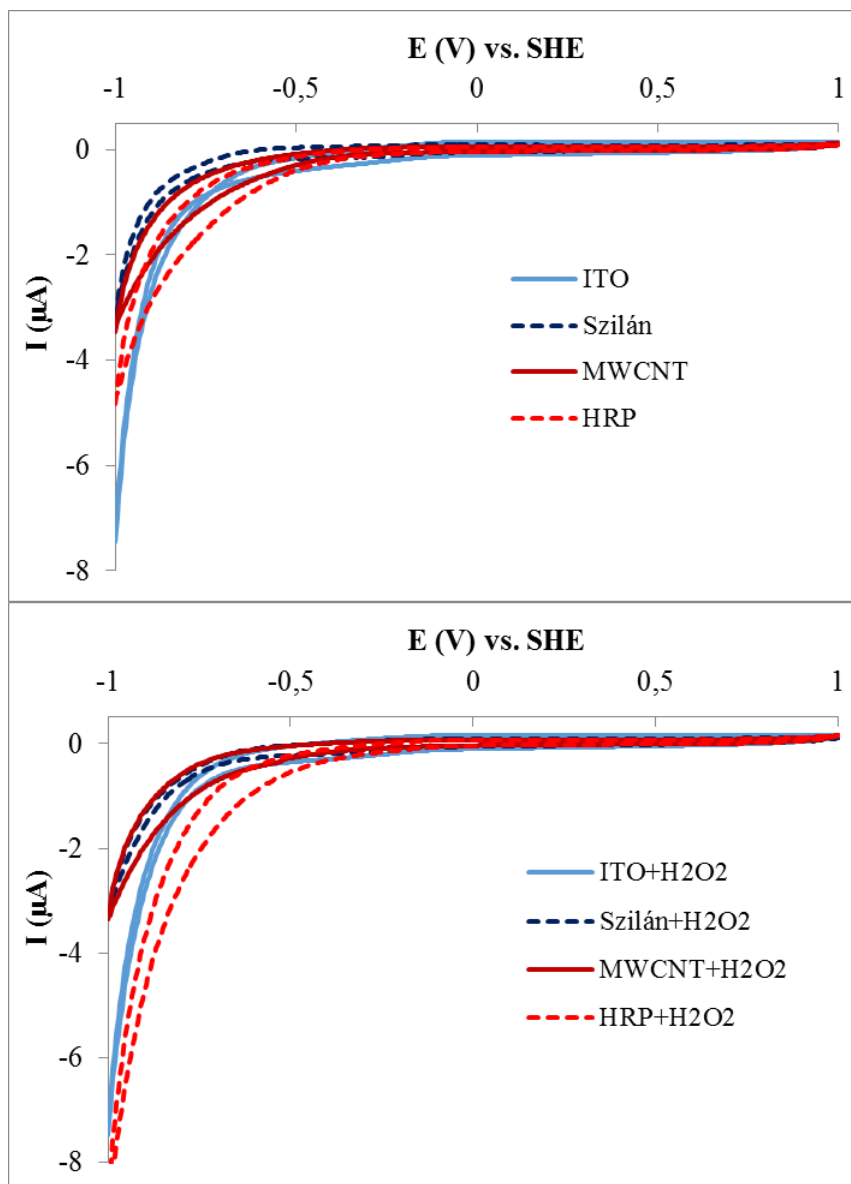
Minta	c_{HRP} (pM)	H_2O_2 (pM/sec)	Enzimaktivitás $M [\text{H}_2\text{O}_2]/(M [\text{HRP}] \cdot \text{sec})$
HRP oldat (gvajakol)	17 900	124 000	7
HRP oldat (AR)	19 220	56 000	3
MWCNT/HRP (gvajakol)	1,9	9,6	5
MWCNT/HRP (AR)	5,6	12	2
ITO/MWCNT/HRP (gvajakol)	2	10	5
ITO/MWCNT/HRP (AR)	2,9	6	2,1

4. táblázat A fluoreszcencia mérésekből származó adatok a kalibrációk felhasználásával HRP oldat, karboxil-MWCNT/HRP komplex és ITO/MWCNT/HRP elektród esetén, gvajakol és amplex red (AR) használatával. Jelölések: c_{HRP} (pM): a rendszerben jelenlévő/kötött enzim koncentrációja pM-ban kifejezve (becsült érték); H_2O_2 (pM/sec): a minták hidrogén-peroxid redukáló sebessége (LOD); Enzimaktivitás ($M [\text{H}_2\text{O}_2]/(M [\text{HRP}] \cdot \text{sec})$): a HRP enzimaktivitása (becsült érték).

5.2.4.1 Ciklikus voltammetria

A létrehozott ITO/MWCNT/HRP elektród aktivitását ezután egy háromelektroddos elektrokémiai cellában is ellenőriztem, azaz ciklikus voltammogramokat vettem fel H_2O_2 hozzáadásával és nélküle (4.3.6 fejezet).

Az elektród preparálása során minden lépés után végeztem mérést 5 mM H_2O_2 jelenlétében és nélküle, annak bizonyítására, hogy az elektród felületére épülő rétegek közül csak a HRP játszik szerepet az elektrokémia változásában. A cellában 50 ml kálium-foszfát puffert (0,1 M; pH 7,0) alkalmaztam elektrolitoldatként, amely 20 mM KCl-ot is tartalmazott. A 46. ábrán látható, hogy a kiindulási ITO, a szilanizált ITO és a MWCNT-et tartalmazó elektród sem mutatott változást H_2O_2 hozzáadása után (Magyar et al., 2013). Ezzel szemben az enzimet tartalmazó elektród H_2O_2 jelenlétében közvetlen katalitikus átmenetet mutatott -350 mV körül, jelezve, hogy az enzimelektrod képes a H_2O_2 bomlását katalizálni. Az eredmények azt mutatják, hogy az elektrontranszfer létrejön az enzim aktív oldala és az elektród között.



46. ábra Az ITO, a szilanizált ITO (Szilán), az ITO-ra rögzített MWCNT-es elektród (MWCNT) és a HRP-t is tartalmazó enzimelektrod (HRP) ciklikus voltammogramja 5 mM H_2O_2 hozzáadása előtt (felső ábra) és után (alsó ábra)

6. Összefoglaló

Munkám során bakteriális fotoszintetikus reakciócentrumból, valamint tormaperoxidáz enzimből hoztam létre biokompozitokat. Különböző kötési eljárásokat alkalmaztam a biológiai anyagok szén nanocsövekhez és ITO felületéhez rögzítésére.

Rhodobacter sphaeroides bíborbaktériumból tisztított RC-ot rögzítettem először egyfalú szén nanocsőhöz fizikai szorpcióval és vizsgáltam a létrejött komplex stabilitását különböző környezeti tényezők (hőmérséklet, inkubálási idő, preparálás során alkalmazott pH) mellett. A kompozit fotoaktivitását fényindukált abszorpcióváltozás kinetikai mérésével határoztam meg a minták üveglapra szárítását követően. Azt tapasztaltam, hogy a detergenst nem tartalmazó, leszárított kompozit minták abszorpcióváltozása lassú komponensének időállandója az első napi mérések során minden esetben meghaladta az oldatbeli, detergenst tartalmazó RC esetén mért 1200 ms-os élettartamot. Az élettartam növekedésének oka egyrészt lehet a RC és a szén nanocső között létrejövő közvetlen redoxkapcsolat, másrészt a RC-on belüli töltéspár stabilizálódása a szén nanocső környezetében. A hőmérsékletfüggés vizsgálatok tekintetében elmondható, hogy a nanocsőhöz fizikailag kötött RC abszorpcióváltozása lassú komponensének időállandója jóval stabilabb az LDAO detergenst tartalmazó szárított RC-éhoz képest, a hőmérséklet pedig részarányának alakulását befolyásolja, így a fehérjét tartalmazó mintáknak a 4 °C-os tárolási körülmények kedvezőek. A preparálás során alkalmazott pH hatása számottevő különbséget nem okoz a komplexek lassú kinetikai komponensének tulajdonságait tekintve, bár a pH 9,0-n készített mintában megkötődött RC koncentrációja jóval kisebb volt. Ennek oka lehet, hogy a minta készítése során a RC-ok nagy része elvesztette aktivitását a magas pH-nak köszönhetően. Összességében a pH 7,0-n preparált minta rendelkezett a legstabilabb tulajdonságokkal és időállandója egy hónapon át 1800 ms körül mozgott. A fizikai szorpcióval létrehozott SWCNT/RC kompozitok még négy hónap elteltével is megtartották aktivitásukat.

Ezt követően különböző kémiai kötési módszereket adaptáltam a mi laboratóriumi körülményeinkhez és ezek segítségével rögzítettem a fehérjét többfalú amino- és karboxil-funkcionált szén nanocsövekhez, keresztkötőszerek

alkalmazásával. A létrejött kompozitok morfológiai tulajdonságait transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltam meg. A kötés során alkalmazott keresztkötőszertől és a preparálás menetétől függően a mérések alapján a különböző komplexekben a kötési eljárást követően egyrétegű és többrétegű (csomós) RC borítás is kialakult a szén nanocső felszínén. A kötődés létrejöttének bizonyítására a MWCNT/RC komplexek abszorpciós spektrumát mértem, amely a 800 nm-nél, a reakciócentrumra karakterisztikusan jellemző csúcs megjelenésével igazolta a RC jelenlétét a komplexekben. Az egyensúlyi abszorpciós spektrum vizsgálata alapján megállapítottam, hogy a kötést követően jelentősen megváltozik a donor környezete a fehérjén belül. Ez a bakterioklorofill monomer és dimer környékén zajló elektrosztatikus kölcsönhatások jellegének megváltozásával magyarázható a fehérje MWCNT-höz való kötését követően. A komplexek fotoaktivitását a fényindukált abszorpcióváltozás kinetikai mérésével határoztam meg, majd a kapott görbéket az elsőrendű kinetikai egyenlet segítségével értékeltem ki. A RC-ot a kémiai kötést követően is lehetséges volt fénnel gerjeszteni. A fénygerjesztés következtében létrejövő töltésrekombinációk lassú fázisának időállandója egyetlen esetben közelítette meg az oldatban lévő reakciócentrum fehérje időállandóját ($\tau_{\text{lassú}} = 1200$ ms, detergensmicellában), sőt azt meg is haladta, mégpedig a karboxil-funkcionált szén nanocsőhöz karbodiimid és szukcinimid keresztkötőszereken keresztül rögzített RC esetében ($\tau_{\text{lassú}} = 1826$ ms). A többi komplex esetén ezek az értékek 630 és 260 ms között mozogtak. A lassú fázis részaránya szinte mindegyik komplex esetén 80-90%-át tette ki a teljes lecsengésnek, csakúgy, mint a RC oldat esetében. Ezzel ellentétben az amino-funkcionált szén nanocsőhöz nikkel komplexen keresztül kötött RC esetén ez jelentősen lecsökkent (41%). Ezt a a kötés során a MWCNT és a RC közé beépülő nikkel komplex következtében kialakuló nagyobb kötési távolság, valamint a glutáraldehid miatt összekötődő reakciócentrumok hatására megváltozó elektrontranszport magyarázhatja.

Létrehoztam elektródokat az amino- és karboxilcsoporttal funkcionált szén nanocsövek és RC ITO (indium-ón-oxid) hordozó felületére történő rögzítésével. Az ITO felületének szilanizálását követően, amely funkciós csoportokat alakított ki a felszínen, keresztkötőszerek segítségével rögzítettem a funkcionált szén nanocsöveket, majd ezekhez ugyancsak keresztkötőszerek alkalmazásával kötöttem a RC-ot. Az így létrejött ITO/MWCNT/RC kompozitokon pásztázó

elektronmikroszkópos felvételekkel igazoltam a kötési eljárások sikerességét. Az elektród fotoaktivitását fényindukált abszorpciókinetikai mérésekkel határoztam meg. A RC-ot a kémiai kötést követően is lehetséges volt fénnel gerjeszteni, azonban az ITO felületén kis mennyiségben jelenlévő RC-nak és a fényszórásnak köszönhetően a mérést csak többszöri ismétlés átlagolását követően tudtam értékelni. Az abszorpcióváltozás mindkét esetben egyfázisú volt, ahol a komponens időállandója amino-MWCNT esetén 600 ms, karboxil-MWCNT esetén pedig 270 ms volt. Készítettem elektródot vezető polimerben rögzített amino-MWCNT/RC komplex alkalmazásával, amely elektrosztatikusan kötődött a polielektrolittal kezelt ITO felületére. A fényindukált abszorpcióváltozás mérés bizonyította, hogy a kötődés létrejött és a RC megtartotta fotokémiai/-fizikai aktivitását. A reakciócentrum kötődésének hatékonyságát befolyásolja a kompozit preparálása során alkalmazott detergens koncentráció. Detergens hiányában ugyanis homogén kötődés jött létre, amit az abszorpcióváltozás monofázikus jellege is bizonyít ($\tau = 482$ ms). Detergens jelenlétében pedig bifázikus, heterogén jelleg mutatkozott, amely a lassú komponens időállandójának megnövekedésével ($\tau_{\text{lassú}} = 570$ ms) járt együtt. Mindkét kötési eljárás (szilán/kereszt-kötőszer és polimer) eredményeinek kiértékelését követően a töltésrekombinációs fázis felgyorsulását tapasztaltam az oldatban mérhető RC paramétereikhez képest. Ennek oka lehet egyrészt a kinonleválás/bekötődés kinetikájának hiánya, amely oldatban megvalósul, itt azonban ez nem következik be. Másrészt a száraz körülmények miatt a mintákban megváltozik a kinonok környezete is, amely hatással van az előreirányuló elektrontranszferre.

A tormaperoxidáz enzimmel végzett kísérletek során a H_2O_2 érzékeny detektálására alkalmas rendszer kidolgozására törekedtem. Ennek érdekében két féle hidrogén donort alkalmaztam (gvajakol, amplex red), amelyek oxidációs termékének felhalmozódása abszorpciós és fluoreszcencia spektroszkópiával követhető. A gvajakol és az amplex red enzimatis oxidációs terméke koncentrációjának megállapításával a hidrogén-peroxid koncentrációváltozása meghatározható abszolút értékben. Az azonos enzimkoncentrációkhoz tartozó abszorpciós kinetikai és fluoreszcencia mérésekből kalibrációkat készítettem, amelyek segítségével meghatároztam a tormaperoxidáz enzimaktivitását (gvajakol: $7 \text{ M } [\text{H}_2\text{O}_2]/(\text{M } [\text{HRP}] \cdot \text{sec})$; amplex red: $3 \text{ M } [\text{H}_2\text{O}_2]/(\text{M } [\text{HRP}] \cdot \text{sec})$) és H_2O_2 kimutatási határát (gvajakol: $124 \text{ nM } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$; amplex red:

56 nM H_2O_2 s^{-1}). Az enzimet rögzítettem karboxil-funkcionált szén nanocső felületén, majd elektródot készítettem a komplex szilanizált ITO felületére történő kötésével. A kötési eljárások sikerességét atomerő mikroszkópos és pásztázó elektronmikroszkópos felvételekkel igazoltam. A hidrogén donorok jelenlétében végzett fluoreszcencia mérések alapján az immobilizált tormaperoxidáz enzim a kötést követően is megtartotta enzimaktivitását és aktív centruma hozzáférhető maradt a szubsztrát számára mindkét esetben. Az oldatbeli tormaperoxidáz esetén végzett kalibrációk felhasználásával meghatároztam a MWCNT/HRP komplex és az ITO/MWCNT/HRP elektród hidrogén-peroxid kimutatási határát és megbecsültem a rögzített enzim enzimaktivitását, valamint koncentrációját. A kimutatási határt tekintve megállapítottam, hogy az általunk alkalmazott rendszerben a létrehozott komplexek akár néhány pM-os koncentrációjú hidrogén-peroxid kimutatására is képesek. A MWCNT/HRP esetében ezek gvajakol esetén 9,6 pM H_2O_2 s^{-1} , amplex red esetén pedig 12 pM H_2O_2 s^{-1} voltak. A létrehozott elektród hidrogén-peroxid kimutatási határa gvajakol esetén 10 pM $\text{H}_2\text{O}_2/\text{sec}$, amplex red esetén pedig 6 pM $\text{H}_2\text{O}_2/\text{sec}$ -nak adódott. Az elektród aktivitását elektrokémiai cellában is ellenőriztem ciklikus voltammetria mérésével.

7. Tudományos megállapítások

Tudományos eredményeim alapján a következő megállapításokat teszem:

1. *Rhodobacter sphaeroides* bíborbaktérium törzsből izolált és tisztított fotoszintetikus reakciócentrum fehérjét (RC) rögzítettem funkcionálatlan egyfalú szén nanocső (SWCNT) felületére fizikai szorpció segítségével, majd üveglapra való szárítását követően vizsgáltam a létrehozott komplex stabilitását befolyásoló környezeti tényezők hatásait. [**Magyar és mtsai., Phys. Status Solidi B, 2011**]

Megállapítottam, hogy

- 1.1 a flashfotolízis kísérletek alapján az immobilizált RC-ok a kötést követően is megtartják fotoaktivitásukat több hónapon keresztül;
 - 1.2 a tisztított RC fehérje fényindukált abszorpcióváltozása lassú komponensének részaránya és időállandója gyorsabb csökkenést mutat az inkubációs idő függvényében, mint a SWCNT/RC komplexek esetében;
 - 1.3 a 4 °C-on tárolt SWCNT/RC komplex fényindukált abszorpcióváltozása lassú komponensének részaránya és időállandója is stabilabb a szobahőmérsékleten tárolt kompozitéhoz képest.
2. A fotoszintetikus reakciócentrum fehérje funkcionált szén nanocsőhöz kémiai úton történő rögzítésére alkalmas különböző kötési stratégiákat adaptáltam a mi laboratóriumi körülményeinkhez.

Megállapításaim:

- 2.1 A fotoszintetikus reakciócentrum fehérjét kémiai úton, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) és NHS (N-hidroxisukcinimid) keresztkötőszerek alkalmazásával aminocsoporttal funkcionált többfalú szén nanocső (MWCNT) felületéhez kötöttem. [**Hajdu és mtsai., Phys. Status Solidi B, 2011**]
 - a) A szerkezeti vizsgálat (TEM) azt mutatja, hogy a RC több rétegben kötődik a szén nanocsőhöz.

- b) Az egyensúlyi abszorpciós spektrum alapján azt mondhatjuk, hogy a kötést követően megváltozik a donor környezete a fehérjén belül.
- c) A donor környezetének megváltozása magyarázható a bakterioklorofill monomer és dimer környékén zajló elektrosztatikus kölcsönhatások jellegének megváltozásával a fehérje MWCNT-höz való kötését követően.
- d) A flashfotolízis kísérletek alapján az immobilizált RC-ok a kötést követően is megtartják fotoaktivitásukat, azonban a töltésrekombináció lassú komponenséhez tartozó időállandó ($\tau_{\text{lassú}} = 368 \text{ ms}$) jelentős csökkenését mutatja az oldatbeli RC-éhoz ($\tau_{\text{lassú}} = 1200 \text{ ms}$) viszonyítva.

2.2 Készítettem bionanokompozitokat a fotoszintetikus reakciócentrum fehérje amino- és karboxil-funkcionált többfalú szén nanocső felületére történő rögzítése révén különböző keresztkötőszerek alkalmazásával (EDC, NHS, szulfo-SMCC). A flashfotolízis kísérletek alapján megállapítottam, hogy az immobilizált RC-ok a kötést követően is megtartják fotoaktivitásukat. [Nagy és mtsai., **Current Protein and Peptide Science, 2014**]

2.3 Létrehoztam szén nanocső/reakciócentrum kompozitot nikkell komplexen keresztül, melynek során amino- és karboxilcsoporttal funkcionált többfalú szén nanocső felületén is kialakítottam nikkell és nitrilotriecetsav komplexét ($\text{NTA} \cdot \text{Ni}^{2+}$), majd ehhez rögzítettem a donor oldalán polihisztidinnel jelölt RC-ot. [Nagy és mtsai., **Current Protein and Peptide Science, 2014**]

3 A fotoszintetikus reakciócentrum fehérje és szén nanocső komplex ITO hordozó felületére való rögzítésével elektródokat hoztam létre, amelyek elektrokémiai cellákban alkalmazhatók.

3.1 A fotoszintetikus reakciócentrum fehérjét kémiai úton, az ITO felületének szilanizálását követően, az arra szulfo-SMCC keresztkötőszer alkalmazásával rögzített amino-funkcionált többfalú szén nanocsőhöz

kötöttem EDC és NHS keresztkötőszerek használatával. [Szabó és mtsai., Phys. Status Solidi B, 2015]

- a) Megállapítottam, hogy elektrokémiai cellákban az ITO/MWCNT elektród felületére immobilizált RC-ok a kötést követően is megtartják redoxaktivitásukat.

3.2 A RC-ot aminocsoporttal funkcionált többfalú szén nanocsőhöz kötöttem PTAA vezető polimeren keresztül, majd az így kapott komplexet PDDA elektrolitoldattal kezelt ITO felületére rögzítettem elektrosztatikai kötésen keresztül. [Szabó és mtsai., Phys. Status Solidi B, 2012]

Megállapításaim:

- a) A flashfotolízis kísérletek eredményei szerint az ITO felületére a vezető polimeren keresztül immobilizált RC-ok a kötést követően is megtartják fotoaktivitásukat.
 - b) A reakciócentrum kötődésének hatékonyságát befolyásolja a kompozit preparálása során alkalmazott detergens koncentráció. Hiánya a RC homogén, míg jelenléte a fehérje heterogén kötődését jelzi.
 - b) A minta fény hatására elektrokémiai cellában fotoáramot termel.
- 4 Meghatároztam a tormaperoxidáz enzim (HRP) enzimaktivitását és H_2O_2 kimutatási határát abszorpciós kinetikai és fluoreszcencia méréseket követően gvajakol hidrogén donor alkalmazásával. [Magyar és mtsai., Phys. Status Solidi B, 2013]

A következő megállapításokat tettem:

- 4.1 Az azonos enzimkoncentrációkhoz tartozó abszorpciós kinetikai és fluoreszcencia mérésekből készített kalibrációk alapján a tormaperoxidáz hidrogén-peroxid kimutatási határa gvajakol alkalmazásával a mi mérési körülményeink között $124 \text{ nM H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$.
- 4.2 Az azonos enzimkoncentrációkhoz tartozó abszorpciós kinetikai és fluoreszcencia mérésekből készített kalibrációk alapján a tormaperoxidáz enzimaktivitása gvajakol alkalmazásával a mi mérési körülményeink között $7 \text{ M [H}_2\text{O}_2\text{]}/(\text{M [HRP]} \cdot \text{sec})$.

- 5 A tormaperoxidáz enzimet kémiai úton, EDC és NHS keresztkötőszerek alkalmazásával többfalú karboxilcsoporttal funkcionált szén nanocső felületéhez kötöttem. [Magyar és mtsai., Phys. Status Solidi B, 2013]

Megállapítottam, hogy

- 5.1 a gvajakol hozzáadásával végzett fluoreszcencia mérések alapján az immobilizált tormaperoxidáz enzim a kötést követően is megtartja enzimaktivitását és aktív centruma hozzáférhető marad a szubsztrát számára;
- 5.2 az oldatbeli tormaperoxidáz esetén végzett kalibrációk felhasználásával a MWCNT/HRP komplex hidrogén-peroxid kimutatási határa $9,6 \text{ pM H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$, amely 6 nagyságrenddel jobb a HRP oldatéhoz képest.
- 6 A tormaperoxidáz enzimet kémiai úton, az ITO felületének szilanizálását követően, az arra EDC és NHS keresztkötőszerek alkalmazásával rögzített karboxil-funkcionált többfalú szén nanocsőhöz kötöttem ugyanezen keresztkötőszerek használatával. [Magyar és mtsai., Phys. Status Solidi B, 2013]
- 6.1 Megállapítottam, hogy a létrehozott komplex elektrokémiai cellában végzett ciklikus voltammetria mérés során katalitikus átmenetet mutat -350 mV körül, amely a H_2O_2 bomlás katalizálására való képességét jelzi. Az elektrontranszfer megvalósul az enzim aktív oldala és az elektród között, azaz a HRP megtartja enzimaktivitását.

8. Közlemények

a, A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

1. **M. Magyar**, K. Hajdu, T. Szabó, K. Hernádi, A. Dombi, E. Horvath, L. Forró, L. Nagy (2011) Long term stabilization of reaction center protein photochemistry by carbon nanotubes, *Phys. Status Solidi B*, 248, No.11, 2454–2457.

IF= 1,316

2. K. Hajdu, T. Szabó, **M. Magyar**, G. Bencsik, Z. Németh, K. Nagy, A. Magrez, L. Forró, Gy. Váró, K. Hernádi, L. Nagy (2011) Photosynthetic reaction center protein in nanostructures, *Phys. Status Solidi B*, 249, No.12, 2700–2703.

IF= 1,316

3. T. Szabó, **M. Magyar**, Z. Németh, K. Hernádi, B. Endrődi, G. Bencsik, Cs. Visy, E. Horváth, A. Magrez, L. Forró, L. Nagy (2012) Charge stabilization by reaction center protein immobilized to carbon nanotubes functionalized by amine groups and poly(3-thiophene acetic acid) conducting polymer, *Phys. Status Solidi B*, 248, No.10, 2386–2389.

IF= 1,489

4. **M. Magyar**, K. Hajdu, T. Szabó, B. Endrődi, K. Hernádi, E. Horváth, A. Magrez, L. Forró, Cs. Visy, L. Nagy (2013) Sensing hydrogen peroxide by carbon nanotube/horse radish peroxidase bio-nanocomposite, *Phys. Status Solidi B*, 250, No.12, 2559–2563.

IF= 1,605

5. L. Nagy, **M. Magyar**, T. Szabó, K. Hajdu, M. Dorogi, L. Giotto, F. Milano (2014) Photosynthetic Machineries in Nano-Systems, Special Issue: “Sensors and transducers in the landscape of photosynthesis”, *Current Protein & Peptide Science*, 15, No. 4, 363-373.

IF= 2,328

6. T. Szabó, E. Nyerki, T. Tóth, R. Csekő, **M. Magyar**, E. Horváth, K. Hernádi, B. Endrődi, Cs. Visy, L. Forró, L. Nagy (2015) Generating photocurrent by nanocomposites based on photosynthetic reaction centre protein, *Phys. Status Solidi B* (accepted)

IF= 1,61

b, Egyéb közlemények

1. T. Szabó, G. Bencsik, **M. Magyar**, Cs. Visy, Z. Gingl, K. Nagy, Gy. Váró, K. Hajdu, G. Kozák, L. Nagy (2013) Photosynthetic reaction centre/ITO hybrid nanostructure, *Materials Science and Engineering C*, 33, 769-774.

IF= 2,736

2. P. Boldog, K. Hajdu, **M. Magyar**, É. Hideg, K. Hernádi, E. Horváth, A. Magrez, K. Nagy, Gy. Váró, L. Forró, L. Nagy (2013) Carbon nanotubes quench singlet oxygen generated by photosynthetic reaction centers, *Phys. Status Solidi B*, 250, No.12, 2539–2543.

IF= 1,605

3. L. Nagy, K. Hajdu, Sz. Torma, S. Csikós, T. Szabó, **M. Magyar**, D. Fejes, K. Hernádi, M. Kellermayer, E. Horváth, A. Magrez, L. Forró (2014) Photosynthetic reaction centre/carbon nanotube bundle composites, *Phys. Status Solidi B*, 251, No.12, 2366–2371.

IF= 1,605

4. I. Husu, **M. Magyar**, T. Szabó, B. Fiser, E. Gómez-Bengoa, L. Nagy (2015) Structure and binding efficiency relations of QB site inhibitors of photosynthetic reaction centres, *Gen. Physiol. Biophys.* 34, 119–133.

IF=0,88

5. L. Nagy, V. Kiss, V. Brumfeld, K. Osvay, Á. Börzsönyi, **M. Magyar**, T. Szabó, M. Dorogi, S. Malkin (2015) Thermal effects and structural changes of photosynthetic reaction centres characterized by wide frequency band hydrophone: Effect of carotenoids and terbutryne, *Photochemistry and Photobiology* (in press)

IF=2,68

6. G.P. Szekeres, K. Németh, A. Kinka, **M. Magyar**, B. Réti, E. Varga, Zs. Szegletes, A. Erdőhelyi, L. Nagy, K. Hernádi (2015) Controlled nitrogen doping and carboxyl functionalization of multi-walled carbon nanotubes, *Phys. Status Solidi B* (in press)

IF=1,61

7. T. Szabó, **M. Magyar**, K. Hajdu, M. Dorogi, E. Nyerki, T. Tóth, M. Lingvay, Gy. Garab, K. Hernádi, L. Nagy (2015) Structural and functional hierarchy in

photosynthetic energy conversion - from molecules to nanostructures,
Nanoscale Research Letters (accepted)

IF=2,48

c, Referált újságban megjelent konferencia absztraktok

1. **M. Magyar**, K. Hajdu, K. Hernádi, E. Horváth, A. Magrez, K. Nagy, Gy. Váró, L. Forró, L. Nagy (2011) Photosynthetic reaction center/carbon nanotube hybrid nanostructures, 2011 Eur Biophys J., 40 (1):35–241, 526.

IF=2,139

2. K. Hajdu, T. Szabó, D. Fejes, **M. Magyar**, Zs. Szegletes, Gy. Váró, E. Horváth, A. Magrez, K. Hernádi, L. Forró, L. Nagy (2013) Carbon nanotube as functional matrix for bacterial photosynthetic reaction centers, Eur. Biophys J., 42 (1):S1-236, 408.

IF= 2,474

3. **M. Magyar**, T. Szabó, B. Endrődi, K. Hajdu, Cs. Visy, Zs. Szegletes, Gy. Váró, E. Horváth, A. Magrez, K. Hernádi, L. Forró, L. Nagy (2013) Photocurrent generated by photosynthetic reaction centers/carbon nanotube/ITO bio-nanocomposite, Eur. Biophys J., 42. (1):S1-236, 411.

IF= 2,474

d, Meghívott előadások

1. **Magyar Melinda** - “Photosynthetic reaction center/carbon nanotube hybrid nanostructures”
Swiss Contribution 7/2, Annual Progress Report, SZAB Székház, Szeged, Magyarország, 2011. szeptember 28.
2. **Magyar Melinda** - “Strategies to bind photosynthetic reaction centers to nano-systems”
PHOTOTECH: Photosynthetic proteins for technological applications: biosensors and biochips – First Plenary Workshop COST Action TD1102, Antwerpen, Belgium, 2012. június 10-12.
3. **Magyar Melinda** - “Strategies to bind redox proteins to nanosystem”
SNSF Swiss National Science Foundation Valorization Meeting, Szeged, Magyarország, 2013. június 5-8.

4. **Magyar Melinda** - “Photocurrent generated by photosynthetic reaction centers/carbon nanotube/ITO bio-nanocomposite”
Bionanotechnology - Recent Advances, Satellite meeting to the 9th European Biophysics Congress EBSA2013, Sesimbra, Portugália, 2013. július 10-13.
5. **Magyar Melinda** - “Strategies to bind photosynthetic reaction centres to carbon nanotubes” (Hungarian)
XXIV. Congress of the Hungarian Biophysical Society, Veszprém, Magyarország, 2013. augusztus 27-30.
6. **Magyar Melinda** - “Redox proteins in carbon nanosystems”
Swiss Contribution 7/2, Final Report, Lausanne, Svájc, 2015. március 29. – április 1.
7. **Magyar Melinda** - “Photosynthetic reaction center protein optoelectronics in nano-hybrid systems” (Hungarian)
Hungarian Chemical Society 2. National conference, Hajdúszoboszló, Magyarország, 2015. augusztus 31. – szeptember 2.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Prof. Bari Ferencnek, az Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra, hogy tanszékén végezhessem a doktori disszertációm megírásához szükséges munkámat.

Hálával és köszönettel tartozom témavezetőimnek, Prof. Hernádi Klárának és Dr. Nagy Lászlónak, akik szakmailag és emberileg is mindenben támogattak és hogy bármikor bizalommal fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm Laskayné Tóth Juditnak, hogy laboránsi munkaköre lelkiismeretes és odaadó ellátásával és barátságával gördülékenyebbé tette a munkát számomra.

Köszönettel tartozom doktorandusztársaimnak, Szabó Tibornak, Hajdu Katának, Kis Mariannak, Sipka Gábornak és Asztalos Emesének a kutatómunkám során nyújtott segítségért, továbbá a csoporton belüli kiváló légkörért. Szeretném megköszönni az Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet minden munkatársának a munkám során nyújtott segítségét.

Köszönet illeti dr. Németh Zoltánt és Berki Pétert a mikroszkópiás vizsgálatok elvégzéséhez nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért.

Köszönöm az Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszéken szolgáló doktorandusztársaimnak, Réti Baláznak és Németh Krisztiánnak a barátságos légkört és a sok segítséget, amit munkám során nyújtottak.

Köszönöm édesanyámnak, hogy egyetemi és doktori tanulmányaim során mindvégig támogatott és hitt bennem a nehéz időkben is.

Fontos megemlítenem, hogy az alább felsorolt projektek nélkül nem jöhetett volna létre az általam elvégzett munka:

- Swiss Contribution (SH/7/2/20)
- Swiss National Scientific Foundation (SNSF IZ73Z0_128037/1)
- PHOTOTEHC COST Action (TD1102)
- TÁMOP (TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0060)

10. Irodalomjegyzék

Alexandre, M., Dubois, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials, *Mater. Sci. Engr.* **2000**, 28, 1-63.

Aranda, P., Darder, M., Fernández-Saavedra, R., López-Blanco, M., Ruiz-Hitzky, E. Relevance of polymer- and biopolymer-clay nanocomposites in electrochemical and electroanalytical applications, *Thin Solid Films* **2006**, 495, 104-112.

Bashar, A.S. Study of Indium Tin Oxide (ITO) for Novel Optoelectronic Devices, Ph.D. thesis **1998**

Banci, L., Carloni, P., Diaz, A., Savellini, G.G. Molecular dynamics calculations on peroxidases: The effect of calcium ions on protein structure, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **1996**, 1, 264-272.

Banci, L. Structural properties of peroxidases, *J. Biotechnol.* **1997**, 53, 253-263.

Becquerel, A. Recherche sur les Effets de la Radiation Chimique de la Lumière Solaire au Moyen de Courant Électrique, *C. R. Acad. Sci.* **1839**, 9, 145–149.

Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szoke, H., Henriksen, A., Hajdu, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution, *Nature* **2002**, 417, 463-468.

Blankenship, R.E., Madigan, M.T., Bauer, C.E. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers* **1995**

Cao, X., Ning, W., Li, L.D., Guo, L. Synthesis and characterization of waxberry-like microstructures ZnO for biosensors, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2008**, 129, 268-273.

- Clarke, J., Shannon, L.M. The isolation and characterization of the glycopeptides from horseradish peroxidase isoenzyme C, *Biochim Biophys Acta*. **1976**, 427, 428–442.
- Clayton, R., Sistrom, W. (Eds.) The Photosynthetic Bacteria, *New York: Plenum Press*. **1978**
- Clayton, R.K. Effects of dehydration on reaction centers from *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *BBA* **1978**, 504, 255-264.
- Collins, P.G., Arnold, M.S., Avouris, P. Engineering carbon nanotubes and nanotube circuits using electrical breakdown, *Science* **2001**, 292, 5517, 706-709.
- Cruz-Silva, R., Amaro, E., Escamilla, A., Nicho, M.E., Sepulveda-Guzman, S., Arizmendi, L., Romero-Garcia, J., Castillon-Barraza, F.F., Farias, M.H. Biocatalytic synthesis of polypyrrole powder, colloids, and films using horseradish peroxidase, *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, 328, 263–269.
- Cuy, J.L., Mann, A.B., Livi, K.J., Teaford, M.F., Weihs, T.P. Nanoindentation Mapping of the Mechanical Properties of Human Molar Enamel, *Arch. Oral Biol.* **2002**, 47, 281-291.
- Daixin, Y., Huixiang, L., Guohai, L., Juan, L., Xianxia, Z., Song, Z., Hui, C., Jilie, K. A three-dimensional hybrid of MnO₂/graphene/carbon nanotubes based sensor for determination of hydrogen-peroxide in milk, *Electrochimica Acta* **2013**, 109, 195– 200.
- Darder, M., Aranda, P., Ruiz-Hitzky, E. Bionanocomposites: A New Concept of Ecological, Bioinspired and Functional Hybrid Materials, *Adv Mater.* **2007**, 19, 1309–1319.
- Dorogi, M., Bálint, Z., Mikó, C., Vilenó, B., Milas, M., Hernádi, K., Forró, L., Váró, G., Nagy, L. Stabilization effect of single walled carbon nanotubes on the functioning of photosynthetic reaction centers, *J. Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 21473-21479.

Dunford, B.H. Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties, in *Peroxidases in Chemistry and Biology*, CRC Press **1991**, 1–24.

Dzyadevych, S.V., Arkhypova, V.N., Soldatkin, A. P., El'skaya, A.V., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future, *Irbm* **2008**, 29, 171-180.

Eggins, B.R. Biosensors: an introduction, Wiley **1996**

Emerson, R., Arnold, A. The photochemical reaction in photosynthesis, *J. gen. Physiol.* **1932**, 16, 191-205.

Estephan, E., Saab, M.B., Agarwal, V., Cuisinier, F.J.G., Larroque, C., Gergely, C. Peptides for the biofunctionalization of silicon for use in optical sensing with porous silicon microcavities, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, 21, 2003-2011.

Feher, G., Allen, J.P., Okamura, M.Y., Rees, D.C. Structure and function of bacterial photosynthetic reaction centers, *Nature* **1989**, 339, 111-116.

Fejes, D., Pápa, Z., Kecsenvity. E., Réti, B., Tóth, Z., Hernádi, K. Super growth of vertically aligned carbon nanotubes on pulsed laser deposited catalytic thin films, *Appl. Phys. A* **2015**, 118, 855–861.

Fiorito, P.A., Brett, C.M.A., de Torresi, S.I.C. Polypyrrole/copper hexacyanoferrate hybrid as redox mediator for glucose biosensors, *Talanta* **2006**, 69, 403-408.

Fischer, H. Polymer nanocomposites: from fundamental research to specific applications, *Materials Science and Engineering: C* **2003**, 23, 763-772.

Fleming, G., vanGrondelle, R. The primary steps of photosynthesis, *Physics Today* **1994**, 47, 48-55.

Forano, C., Vial, S., Mousty, C. Nanohybrid enzymes — layered double hydroxides: potential applications, *Curr. Nanosci.* **2006**, 2, 283-294.

Füvesi, H. A fotoszintetikus reakciócentrum fehérje és az egyfalú szén nanocső közötti kölcsönhatás, diplomamunka, Szegedi Tudományegyetem, **2007**

Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T., Poulos, T.L. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 1032-1038.

Granqvist, C.G., Hultaker, A. Transparent and Conducting ITO Films: New Developments and Applications, *Thin Solid Films* **2002**, 411, 1-5.

Greco, O., Rossiter, S., Kanthou, C., Folkes, L.K., Wardman, P., Tozer, G.M., Dachs, G.U. Horseradish peroxidase-mediated gene therapy: choice of prodrugs in oxic and anoxic tumor conditions, *Mol. Cancer Ther.* **2001**, 1, 151-160.

Hajdu, K., Szabó, T., Magyar, M., Bencsik, G., Németh, Z., Nagy, K., Magrez, A., Forró, L., Váró, Gy., Hernádi, K., Nagy L. Photosynthetic reaction center protein in nanostructures, *Phys. Status Solidi B* **2011**, 249, 2700–2703.

Harmer, M., Chan, H.M., Miller, G.A. Unique opportunities for microstructural engineering with duplex and laminar ceramic composites, *Journal of the American Ceramic Society* **1992**, 75, 1715-1728.

Herren, J.I., Kunzelman, K.S., Vocolka, C., Cochran, R.P., Spiess, B.D. Horseradish Peroxidase as a Histological Indicator of Mechanisms of Porcine Retinal Vascular Damage and Protection With Perfluorocarbons After Massive Air Embolism, *Stroke* **1997**, 28, 2025–2030.

Howes, B.D., Feis, A., Raimondi, L., Indiani, C., Smulevich, G. The critical role of the proximal calcium ion in the structural properties of horseradish peroxidase, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 40704-40711.

Hughes, A.V., Rees, P., Heathcote, P., Jones, M.R. Kinetic analysis of the thermal stability of the photosynthetic reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides*, *Biophys. J.* **2006**, 90, 4155–4166.

- Humberston, D.B., Krenzelok, E.P. Ingestion of 35% hydrogen peroxide, *Journal of Toxicology – Clinical Toxicology* **1990**, 28, 95-100.
- Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature* **1991**, 354, 56-58.
- Kaplan, S., Arntzen, C. Photosynthetic membrane structure and function. In *Photosynthesis, Energy Conversion by Plants and Bacteria* (ed. Govindjee), *New York: Academic Press*. **1982**, 1, 65-151.
- Kirmaier, C., Bautista, J.A., Laible, P.D., Hanson, D.K., Holten, D. Probing the contribution of electronic coupling to the directionality of electron transfer in photosynthetic reaction centers, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 24160–24172.
- Kroto, H.W., Heath, J.R., O'Brien, S.C., Smalley, R.E. C-60 - Buckminsterfullerene, *Nature* **1985**, 318, 162-163.
- Laberge, M., Huang, Q., Schweitzer-Stenner, R., Fidy, J. The Endogenous Calcium Ions of Horseradish Peroxidase C Are Required to Maintain the Functional Nonplanarity of the Heme, *Biophys. J.* **2003**, 84, 2542-2552.
- Lebedev, N., Trammell, S.A., Tsoi, A., Spano, A., Kim, J.H., Xu, K., Twigg, M.E., Schnur, J.M. Increasing efficiency of photoelectronic conversion by encapsulation of photosynthetic reaction center proteins in arrayed carbon nanotube electrode, *Langmuir* **2008**, 24, 8871–8876.
- Li, X., Chang, W.-C., Chao, Y.J., Wang, R., Chang, M. Nanoscale structural and mechanical characterization of a natural nanocomposite material: the shell of red abalone, *Nano Lett.* **2004**, 4, 613-617.
- Maehly, A.C., Chance, B. The assay of catalases and peroxidase in: *Methods of Biochemical Analysis* (D. Glick, ed.) **1954**, 1, 357, Interscience Publishers
- Magrez, A., Seo, J.W., Miko, C., Hernádi, K., Forró, L. Growth of carbon nanotubes with alkaline earth carbonate as support, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 10087-10091.
- Magrez, A., Kasas, S., Salicio, V., Pasquier, N., Seo, J. W., Celio, M., Catsicas, S., Schwaller, B., Forró, L. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials, *Nano Letters* **2006**, 6, 1121–1125.

Magyar, M., Hajdu, K., Szabó, T., Hernádi, K., Dombi, A., Horváth, E., Forró, L., Nagy L. Long term stabilization of reaction center protein photochemistry by carbon nanotubes, *Phys. Status Solidi B* **2011**, 248, 2454–2457.

Magyar, M., Hajdu, K., Szabó, T., Endródi, B., Hernádi, K., Horváth, E., Magrez, A., Forró, L., Visy, Cs., Nagy, L. Sensing hydrogen peroxide by carbon nanotube/horse radish peroxidase bio-nanocomposite, *Phys. Status Solidi B* **2013**, 250, 2559–2563.

McLaren, A.D., Peterson, G.H. Montmorillonite as a Caliper for the Size of Protein Molecules, *Nature* **1961**, 192, 960-961.

Milano, F., Trotta, M., Dorogi, M., Fischer, B., Giotta, L., Agostiano, A., Maróti, P., Kálmán, L., Nagy, L. Light induced transmembrane proton gradient in artificial lipid vesicles reconstituted with photosynthetic reaction centers, *Bioenerg. Biomembr.* **2012**, 44, 373-384.

Mitchel, P. Chemiosmotic coupling in energy transduction: A logical development of biochemical knowledge, *Journal of Bioenergetics* **1972**, 3, 5–24.

Morishima, I., Kurono, M., Shiro, Y. Presence of endogenous calcium ion in horseradish peroxidase. Elucidation of metal-binding site by substitutions of divalent and lanthanide ions for calcium and use of metal-induced NMR (¹H and ¹¹³Cd) resonances, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 9391–9399.

Moser, C.C., Keske, J.M., Warncke, K., Farid, R., Dutton, P.L. Nature of biological electron transfer, *Nature* **1992**, 355, 796–802.

Nagy, L., Puskás, Á., Tandori, J., Droppa, M., Horváth, G. Effect of DCMU on photosynthetic purple bacteria, *Photosynthetica* **1991**, 25, 167-171.

Nagy, L., Hajdu, K., Fisher, B., Hernádi, K., Nagy, K., Vincze, J. Photosynthetic Reaction Centres – from Basic Research to Application Possibilities, *Notulae Scientia Biologica* **2010**, 2, 07-13.

Nagy, L., Magyar, M., Szabó, T., Hajdu, K., Dorogi, M., Giotta, L., Milano F. Photosynthetic Machineries in Nano-Systems, Special Issue: “Sensors and

transducers in the landscape of photosynthesis”, *Current Protein & Peptide Science* **2014**, 15, 363-373.

Nelson, A., Cox, D., Lehninger, M. Principles of Biochemistry, *W H Freeman & Co.* **2009**.

Okamura, M.Y., Steiner, M.A., Feher, G. Characterisation of reaction centers from photosynthetic bacteria. I. Subunit structure of the protein mediating the primary photochemistry in *Rhodospseudomonas spheroides* R-26, *Biochemistry* **1974**, 13, 1394–1402.

Ort, D., Yocum, C. (Eds.) Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions, *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers* **1996**

Paddock, M.L., Rongey, S.H., McPharson, P.H., Juth, A., Feher, G., Okamura, M. Pathway of proton transfer in bacterial reaction centres: role of aspartate-L213 in proton transfer associated with reduction of quinone to dihydroquinone, *Biochemistry* **1994**, 33, 734-745.

Peterlik, H., Roschger, P., Klaushofer, K., Fratzl, P. From brittle to ductile fracture of bone, *Nat. Mater.* **2006**, 5, 52-55.

Pingarron, J. M., Yanez-Sedeno, P., Gonzalez-Cortes, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, *Electrochimica Acta* **2008**, 53, 5848-5866.

Rinyu, L. A primer kinon energetikai változásai a fotoszintetizáló baktériumok reakciócentrumában: mutáció, késleltetett fluoreszcencia és modell-számítások, Ph.D. disszertáció, Szegedi Tudományegyetem, **2007**

Shan, D., Li, Q.B., Ding, S.N., Xu, J.Q., Cosnier, S., Xue, H.G. Reagentless biosensor for hydrogen peroxide based on self-assembled films of horseradish peroxidase/laponite/chitosan and the primary investigation on the inhibitory effect by sulfide, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 26, 536-541.

Shoseyov, O., Levy, I. Nanobiotechnology: Bioinspired Devices and Materials of the Future, *Totowa, NJ: Humana Press. Inc* **2008**.

Shulga, O., Kirchhoff, J.R. An acetylcholinesterase enzyme electrode stabilized by an electrodeposited gold nanoparticle layer, *Electrochemistry Communications* **2007**, 9, 935-940.

Singh, M., Verma, N., Garg, A.K., Redhu, N. Urea biosensors, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2008**, 134, 345-351.

Smith, A.T., Veitch, N.C. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases, *Curr. Op. Struct. Biol.* **1998**, 2, 269–278.

Song, Z., Yuan, R., Chai, Y., Zhuo, Y., Jiang, W., Su, H., Che, X., Li, J. Horseradish peroxidase-functionalized Pt hollow nanospheres and multiple redox probes as trace labels for a sensitive simultaneous multianalyte electrochemical immunoassay, *Chem. Commun. (Camb.)* **2010**, 46, 6750-6752.

Sotiropoulou, S., Chaniotakis, A.N. Carbon nanotube array-based biosensor, *Anal. Bioanal. Chem* **2003**, 375, 103-105.

Straley, S.C., Parson, W.W., Mauzerall, D.C., Clayton, R.K. Pigment content and molar extinction coefficients of photochemical reaction centers from *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, 305, 597-609.

Szabó, T., Magyar, M., Németh, Z., Hernádi, K., Endrődi, B., Bencsik, G., Visy, Cs., Horváth, E., Magrez, A., Forró, L., Nagy, L. Charge stabilization by reaction center protein immobilized to carbon nanotubes functionalized by amine groups and poly(3-thiophene acetic acid) conducting polymer, *Phys. Status Solidi B* **2012**, 248, 2386–2389.

Szabó, T., Nyerki, E., Tóth, T., Csekő, R., Magyar, M., Horváth, E., Hernádi, K., Endrődi, B., Visy, Cs., Forró, L., Nagy L. Generating photocurrent by nanocomposites based on photosynthetic reaction centre protein, *Phys. Status Solidi B* **2015**, (accepted)

Szigeti, K., Smeller, L., Osvath, S., Majer, Z., Fidy, J. The structure of horseradish peroxidase C characterized as a molten globule state after Ca^{2+} depletion, *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1784, 1965-1974.

- Tandori, J., Nagy, L., Puskas, A., Droppa, M., Horvath, G., Maróti, P. The IleL229 --> met mutation impairs the quinone binding to the Q_B-pocket in reaction centers of Rhodobacter Sphaeroides, *Photos. Res.* **1995**, 45, 135-146.
- Tapas, K., Saswata, B., Partha, K., Ananta, K.M., Nam, H.K., Joong, H.L. Recent advances in graphene-based biosensors, *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, 26, 4637-4648.
- Teles, F.R.R., Fonseca, L.P. Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors, *Mat. Sci. & Eng. C* **2008**, 28, 1530-1543.
- Tjong, S.C., Wang, G.S. High-cycle fatigue properties of Al-based composites reinforced with in situ TiB₂ and Al₂O₃ particulates, *Materials Science and Engineering: A* **2004**, 386, 48-53.
- Tkac, J., Whittaker, J.W., Ruzgas, T. The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, 22, 1820-1824.
- Vergauwen, B., Pauwels, F., Van Beeumen, J.J. Glutathione and Catalase Provide Overlapping Defenses for Protection against Respiration-Generated Hydrogen Peroxide in Haemophilus influenzae, *Journal of Bacteriology* **2003**, 5555–5562.
- Wakeham, M.C., Jones, M.R. Rewiring photosynthesis: engineering wrong-way electron transfer in the purple bacterial reaction centre, *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, 33, 851–857.
- Welinder, K.G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, 2, 388-393.
- Wraight, C.A. Proton and electron transfer in the acceptor quinone complex of photosynthetic reaction centers from Rhodobacter sphaeroides, *Front. Biosci.* **2004**, 9, 309–337.

Wraight, C.A., Clayton, R.K. The absolute quantum efficiency of bacteriochlorophyll photooxidation in reaction centres of *Rhodospseudomonas spheroides*, *Biochim. biophys. Acta* **1974**, 333, 246-260.

Xiaoyan, L., Yuanxiang, L., Lichun, Z., Mingjun, D., Zhonghua, X., Xiaoquan, L., Xiuhui, L. A novel nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on silvernanoparticles and ionic liquid functionalized multiwalled carbonnanotube composite modified electrode, *Electrochimica Acta* **2013**, 113, 170– 175.

Xiuhui, L., Caihong, B., Zhihan, N., Lichun, Z., Yu, Q., Xiaoquan, L. Enzymes immobilized on amine-terminated ionic liquid-functionalized carbon nanotube for hydrogen peroxide determination, *Talanta* **2013**, 105, 63-68.

Yan, Y.M., Baravik, I., Yehezkeli, O., Willner, I. Integrated Electrically Contacted Glucose Oxidase/Carbon Nanotube Electrodes for the Bioelectrocatalyzed Detection of Glucose, *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, 112, 17883-17888.

Yanfeng, W., Jie, D., Yaya, L., Duoliang, S., Xibin, Z., Zhonghua, X., Xiaoquan, L. An amperometric biosensor for hydrogen peroxide by adsorption of horseradish peroxidase onto single-walled carbon nanotubes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, 90, 62-67.

Yao, H., Hu, N. pH-Switchable Bioelectrocatalysis of Hydrogen Peroxide on Layer-by-Layer Films Assembled by Concanavalin A and Horseradish Peroxidase with Electroactive Mediator in Solution, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 3380-3386.

Yoon-Mee, L., Kwon, O.Y., Yoon, Y.J., Ryu, K., Immobilization of horseradish peroxidase on multi-wall carbon nanotubes and its electrochemical properties, *Biotechnol. Lett.* **2006**, 28, 39–43.

Zhang, D.L. Processing of advanced materials using high-energy mechanical milling, *Prog. Mater. Sci.* **2004**, 49, 537-560.

Zuber, H., Cogdell, R. Structure and organization of purple bacterial antenna complexes. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (eds. R. Blankenship, M.

Madigan & C. Bauer), *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers* **1995**, 315-348.

SUMMARY

During my research work I have prepared biocomposites from photosynthetic reaction centre protein and horseradish peroxidase. Different binding methods were used to immobilize the biomaterials to carbon nanotubes and ITO.

I bound photosynthetic reaction centre protein purified from *Rhodobacter sphaeroides* purple bacteria to non-functionalized single walled carbon nanotubes by physical binding, then I investigated the conditions (temperature, pH applied during preparation, incubation time) affecting the stability of SWCNT/RC complexes. After drying the samples on glass, the photoactivity of the composites were determined by light-induced absorption kinetic measurements. I noticed that on the first day the lifetime of the slow component of the dried samples not containing detergent exceeded the one measured in the case of RC solution ($\tau_{\text{slow}} = 1200$ ms). The reason of the increased lifetime on one hand can be the direct redox interaction between the RC and carbon nanotube. On the other hand, it can be explained by the stabilization of the charge pair within the protein because of the carbon nanotube. According to the investigations of temperature dependence it can be claimed, that at 4 °C, both the contribution and the lifetime of the slow phase is more stable as compared to the case of room temperature. The pH used during the preparation doesn't result relevant difference between the activity of the samples, except on the case of pH 9.0, where the measurements showed less RC attached to the SWCNT, probably because of the activity loss thanks to the high pH. On the whole, pH 7.0 owned the most stable parameters and its lifetime remained at around 1800 ms for a month. The immobilized RCs kept their photoactivity for several months.

After this, I adapted different chemical binding strategies to our laboratory circumstances in order to bind RCs to amino- and carboxyl functionalized multiwalled carbon nanotubes, with different crosslinkers. The morphological characteristics of the composites were investigated by transmission electronmicroscopy. Depending on the applied crosslinker and the preparation method both mono- and multilayer RC coverage evolved in the different complexes. I measured the MWCNT/RC complexes' absorption spectra which

showed the presence of the RC in the complex with the appearance of the RC's characteristic peak at 800 nm. Steady state absorption spectra confirmed that there is a dramatic change in the environment of the donor within the protein. The change in the environment of the donor indicates that there is a change in the electrostatic interactions around the bacteriochlorophyll monomer and dimer within the protein after the binding to the MWCNTs. The photoactivity of the complexes was investigated by light-induced absorption kinetic measurements and the curves were evaluated by the first order kinetic equation. The lifetime of the slow phase after light excitation reached and even passed the 1200 ms (RC solution) in only one complex, which was the RC bound to carboxyl-MWCNT by carbodiimide and succinimide crosslinkers ($\tau_{\text{slow}} = 1826$ ms). Other complexes owned a lifetime between 260 ms and 630 ms. The contribution of the slow phase was at around 80-90% in almost every complex, which was in good agreement with the one measured in RC solution. In case of RC bound to amino-MWCNT through nickel complex it was only 41%, which can be explained by the longer binding distance between the RC and MWCNT. Other explanation can be that the applied crosslinker (glutaraldehyde) creates RC clusters which results the change of the electrontransport.

I prepared electrodes by the immobilization of RCs and amino- and carboxyl-functionalized carbon nanotubes on the surface of ITO (indium tin oxide). After the silanization of ITO, which creates functional groups on it, I immobilized the functionalized carbon nanotubes with crosslinkers on its surface then the RC was bound to them also with crosslinkers. Morphological characterization (SEM) showed that the binding was successful. According to the flash-photolysis measurements the immobilized RCs kept their photoactivity even after the binding to the ITO. The absorption change was monophasic in both cases ($\tau_{\text{amino}} = 600$ ms, $\tau_{\text{carboxyl}} = 270$ ms). I also prepared electrode by the immobilization of amino-MWCNT/RC complex through conductive polymer which was bound to the polyelectrolyte covered ITO electrostatically. According to the flash-photolysis measurements the immobilized RCs kept their photochemical/-physical activity even after the binding to the ITO. The efficiency of the binding was highly affected by the detergent concentration. The absence of detergent indicated homogenous ($\tau = 482$ ms), the presence of it indicated heterogenous binding ($\tau_{\text{lassú}} = 570$ ms). In both cases (silanization/crosslinker and

polymer), I observed the speed-up of the recombination phase compared to the RC solution. One explanation can be the absence of the kinetics of quinone detachment/binding which can be seen in solution. Other explanation is that the environment of the quinone changes because of the dry conditions, which has effect on the forward electrontransfer.

During working with horseradish peroxidase my aim was to create a system suitable for detecting H_2O_2 in a sensitive way. I applied two kinds of substrates (guaiacol and amplex red), which reagents can be simply oxidized and their oxidation results in colored products (tetraguaiacol and resorufin). The accumulation of these products can then be easily detected by specific light absorption or emission (fluorescence). By determining the concentration of the products, the concentration change of the hydrogen peroxide can be calculated in absolute value. By using the calibration made from the absorption kinetic and fluorescence measurements belonging to the same enzyme concentrations, I determined the enzyme activity of horseradish peroxidase (guaiacol: $7 \text{ M } [\text{H}_2\text{O}_2]/(\text{M } [\text{HRP}] \cdot \text{sec})$; amplex red: $3 \text{ M } [\text{H}_2\text{O}_2]/(\text{M } [\text{HRP}] \cdot \text{sec})$) and the limit of detection of H_2O_2 (guaiacol: $124 \text{ nM } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$; amplex red: $56 \text{ nM } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$). I bound the enzyme to carboxyl-functionalized carbon nanotubes, then I prepared an electrode by immobilizing the complex on the surface of the silanized ITO. Morphological characterization (AFM, SEM) of the complex and electrode showed that the binding was successful. According to the fluorescence measurements made by the addition of guaiacol and amplex red the immobilized HRP kept its enzyme activity even after the binding and its active centre stayed accessible to the substrate. By using the calibration made from the absorption kinetic and fluorescence measurements belonging to the same enzyme concentrations (in the case of HRP solutions) I determined the limit of detection of H_2O_2 of the complex and the electrode (MWCNT/HRP: with guaiacol $9,6 \text{ pM } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$; with amplex red $12 \text{ pM } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$; ITO/MWCNT/HRP: with guaiacol $10 \text{ pM } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$; with amplex red $6 \text{ pM } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$).